

# THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, KYOTO; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka, TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUJI SUYEGOSHI, Tokyo, MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

**SAMURO KAKIUCHI**

Professor in the Tokyo Imperial University

*Reprinted by*  
**TOA BOOK EXPORTS, INC.**

Tokyo Kosho Kaikan Building  
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo  
CABLE: Toaperiodical, Tokyo  
PHONE: Tokyo 291-1448



## STUDIES ON BIOLOGICAL REDUCTION.

### VI. The Oxidation of Sugar by Striated and Heart Muscles of Fowls Fed on Polished Rice and the Behavior of Adrenal Cortex.

By

TADAWO SAKAI.

(From The Institute of Biochemistry, Kyushu Imperial University, Fukuoka.  
Director: Prof. Dr. K. Kodama.)

(Received for publication, April 23, 1934)

It was postulated by various investigators that one of the important aethiological factors of polished rice disease is the depression of oxidation process of various organs. Thus Abderhalden (1920-1921) and Hess (1921) determined the gas exchange of fowls under polished rice feeding and found that it was reduced to a considerable extent. They ascribed this to the diminution of glutathion, which is assumed to be a catalyst in biological reduction.

But Drummond and his coworkers (1926) were unable to confirm the above result. By Thunbergs' methylenblue technic and Barcroft's-Warburgs microrespiratometric method they observed that there is no difference between hunger and polished rice feeding. The apparent diminution in the oxidation power of the various tissues of fowls with rice disease was caused by inanition.

The present work was carried out with the intention to re-examine the oxidation of the tissues chiefly from the standpoint of dehydrogenase activity.

As is shown in the foregoing communications of this series, the reducing agents in heart or red muscles consist of hexosephosphate and its dehydrogenase with the aid of the coferment.

It seems important, therefore, to investigate whether there is any depression of the oxidationsability and whether this is caused by the diminution or lack of one of these components.



EXPERIMENT I. BIOZUCKER (HEXOSEPHOPHATE)-CONTENT  
OF THE RED MUSCLE OF FOWLS DEFICIENT  
IN VITAMIN B.

The fowls were fed on polished rice and water for 3-4 weeks until typical symptoms of polyneuritis ensued. As the controls another group were fed on unpolished rice and water, sometimes only with water.

The extraction of biosugar from red muscle was carried out as follows: when the symptom of polyneuritis became obvious, the fowls were killed by decapitation, bled as much as possible, and the leg muscle was removed immediately. This was put into a flask with wide neck, into which 5% trichloroacetic acid in the proportion of 100 cc. for 100 grams of muscle was previously introduced and cooled in a cold mixture, minced by the scissors, transferred into a mortar and then made into paste with the aid of sea sand. Filtered. To the filtrate, saturated baryta was added to complete neutralisation and then two volumes of 95% methyl alcohol, upon which a flocculent white precipitate resulted. After 1 to 2 hours, this was centrifugalized. To the precipitate, an equal volume of water was added and the whole was mixed well till completely dissolved. This was used as 50% red muscle extract.

The extracts from normal and acute hunger fowls were prepared exactly in the same manner.

Since heart muscle showed the strongest activity of dehydrogenase when tested according to methylenblue technique of Thunberg, this was used throughout the experiment as the enzyme prepartate. Fresh beef heart muscle was brought to the laboratory from the slaughter-house. This was minced by a chopping machine and washed thoroughly in running water for 3 hours, then squeezed out between filter papers and weighed. Then this was made into paste with sea sand in a mortar, and a sufficient amount of  $M/15$  phosphate buffer (PH 7.17) was added so as to make 10% suspension of the muscle. This was prepared fresh every time before use.

As coferment, extract of suprarenal cortex was used. This was prepared from fresh suprarenal cortex by the method described by

Tsukano (1932) and kept as powder.

To determine the dehydrogenase activity, the methylenblue reduction method was applied.

Into the vacuum-tube of Thunberg were introduced 1.0 cc. of 50.0 percent red muscle extract, 1.0 cc. of 10.0 percent heart muscle emulsion, 1.0 cc. of 0.1 percent suprarenal cortex extract and 1.0 cc. of *M*/5000 methylenblue solution.

After being evacuated for 2 minutes at the pressure of 2 mm. of mercury by a vacuum-pump, the tube was placed in a thermostat kept at 40°C and the time of decolorization was measured.

The result is summarised in Table I.

TABLE I.

The decolorization time (in minutes) of red muscle extracts of normal, of acute hunger, and of vitamin-B deficient fowls.

Reaction system.

10% bull heart muscle emulsion	1.0 cc.
0.1% suprarenal cortex extract	1.0 cc.
<i>M</i> /5000 methylenblue	1.0 cc.
muscle extract	1.0 cc.

No.	Normal fowls	Acute hunger	Vitamin-B deficient
1	12'	15'	33'
2	12'	15'	30'
3	12'	15'	35'
4	11'	15'	35'
5	12'		35'
6			43'
Average	12'	15'	35'

(In absence of muscle extract, more than 120 minutes were necessary for complete decolorization).

It is apparent from the above table, that the decolorization time of red muscle extract of fowls under acute inanition was prolonged only slightly compared with that of normal nutrition, while that of vitamin-B deficient fowls was delayed to a great extent.

The result of this experiment clearly reveals that the feeding



of vitamin-B deficient diet caused the diminution of  $H_2$ -donator. Since this substance was proved to be a hexosephosphate by Kodama (1932), it might be well assumed that carbohydrate metabolism in rice-diseased fowls is injured.

## EXPERIMENT II. DEHYDROGENASE-ACTIVITY OF HEART MUSCLE OF VITAMIN-B DEFICIENT FOWLS.

The dehydrogenase preparates of heart muscle of vitamin-B deficient fowls were prepared as follows. As soon as the animals were killed, the heart was taken out, minced by a chopping machine, washed thoroughly in running water for 3 hours and squeezed between filter papers. This was made into paste with sea sand in a mortar and a sufficient amount of *M*/15 phosphate buffer (PH 7.17) was added, so as to make 10% suspension of the muscle.

1.0 cc. of this suspension was mixed with 1.0 cc. of 1.0 percent watery solution of candiolin, 1.0 cc. of 0.2 percent watery solution of suprarenal cortex extract, and 1.0 cc. of *M*/10.000 methylenblue solution in the Thunbergs' tube.

After being evacuated for 2 minutes, the tube was placed in a thermostat kept at 40°C and the time of decolorization was measured. The result is given in Table II.

TABLE II.

The decolorization time of heart muscle emulsion of normal, of a acute hunger and of vitamin-B deficient fowls.

No.	Normal fowls	Acute hunger	Vitamin-B deficient
1	12'	13'	30'
2	13'	12'	25'
3	12'	12'	35'
4	12'		32'
Average	12'	12'	31'

Here again we observe no difference between normal and acute inanition, but a noteworthy reduction in the case of polished rice feeding.

It can be concluded, therefore, that the function of heart

muscle is severely injured by polished rice feeding, owing to the deficiency of dehydrogenase activity as well as oxidizable substances.

EXPERIMENT III. THE INFLUENCE OF VITAMIN-B DEFICIENT  
DIET UPON THE COFERMENT CONTENT  
OF SUPRARENAL CORTEX.

McCarrison (1920) first called attention to the fact that in the case of B-avitaminose, adrenal gland showed a decided hypertrophy, whereas other tissues and organs rather lost weight. Verzar and Peter (1924) observed that this hypertrophy was limited to the cortical portion of the gland. Since the real function of the adrenal cortex is obscure, the significance of this hypertrophy has been little understood. But it was pointed out by Tokumitsu (1918) that the cortex of the gland has a great concern with the carbohydrate metabolism of the animal body. In this line, Nagai (1932), in our laboratory, also made a valuable observation that the hypertrophy in B-avitaminose was associated with the increase of coferment content. Repeating Nagai's experiment once more, the author fully confirmed his result, as is shown in Table III.

TABLE III.  
The effect of B-avitaminose upon the coferment content of  
adrenal cortex.

No.	Normal fowls		Vitamin-B deficient fowls	
	Weight of supra-renal gland per kg body weight (gm.)	Time of decolorization	Weight of supra-renal gland per kg body weight (gm.)	Time of decolorization
1	0.071	10'	0.136	5' 30"
2	0.097	10'	0.210	5' 30"
3	0.086	10'	0.163	5' 30"
4			0.150	5' 30"
Average	0.085	10'	0.165	5' 30"



It seems to be true, therefore, that this hypertrophy may be the result of increased production of coferment important for carbohydrate combustion in the animal body, owing to the excessive feeding of rice.

EXPERIMENT IV. CAN VITAMIN-B<sub>1</sub> RESTORE THE OXIDATIVE POWER OF THE MUSCLE AND CHECK THE HYPERTROPHY OF ADRENAL CORTEX OF AVITAMINISED FOWLS?

To raise conclusive evidence that the retardation of carbohydrate combustion in the muscle and the hypertrophy of suprarenal cortex of the animals fed on polished rice is due to the deficiency of vitamin-B, the author tested how the application of vitamin-B<sub>1</sub> effects these findings.

The fowls were fed on polished rice and when attacked by typical symptoms of polyneuritis, 0.06–0.5 g. of "Oryzanin fortius Sankyo" as indicated in the table, was introduced per os or hypodermically. After certain intervals of time, the animals were killed and the H<sub>2</sub>-donator content of the muscle, the dehydrogenase content of the heart muscle, and the coferment content of the suprarenal cortex, were determined exactly in the same manner as is described in the foregoing experiments. The results are summarised in table IV.

Comparing these data with those of the foregoing tables, the following points are noticeable.

1) The content of H<sub>2</sub>-donator in the red muscle is nearly restored to the normal level, except No. 5 and 6, being the decolorization time, here 12–16 minutes against 11–12 minutes of normal fowls.

2) The dehydrogenase activity was recovered in the examples of No. 2. 3. 7. 8. 9, being 12–16 minutes against 12–13 minutes of healthy animals (compare Table II.) In other examples where the animals were severely injured, recovery was not attained.

3) In the animals of No. 1. 2. 3, where small dosis of vitamin-B was given for 15–30 days and the animals were killed when the avitaminotic symptoms had disappeared, we found that the behavior of suprarenal cortex turned nearly to the normal.



TABLE IV.

The effect of vitamin-B upon the H<sub>2</sub>-donator content of red muscle, the dehydrogenase content of heart muscle and the coferment content of suprarenal cortex.

No.	Decoloriza- tion time of 50 % red muscle extract	Decoloriza- tion time of 10 % heart muscle emulsion	Weight of suprarenal gland per kg body weight (gm.)	Decoloriza- tion time of 2 % supra- renal gland extract	Body weight (kg.)	Remarks
1	16'	30'	0.123	10'	28/IX 1.060 28/X 1.265	Since 1/IX rice feed, 25/IX weak paretic, nearly sitting posture, since 28/IX 0.06 g of oryzanin per day, 28/X nearly normal, killed.
2	—	46'	0.115	9'	5/X 1.345 31/X 1.265	Since 1/IX rice feed, 26/IX weak paretic, since 28/IX 0.06 g of oryzanin per day, 31/X nearly normal, killed.
3	12'	11'	0.099	9'	25/X 1.580 10/XI 1.510	Since 21/IX rice feed, 24/X weak paretic, mostly sitting posture, since 25/X 0.06-0.09 g of oryzanin per day, 10/X normal, killed.
4	12'	30'	0.113	9' 30"	direct before injection 1.310 killed	Since 29/X rice feed, 16/XII weak paretic, 16/XII 0.5 g oryzanin twice per day, 17/XII killed.
5	40'	33'	0.147	6' 30"	direct before injection 1.140 killed 1.130	Since 15/XI rice feed, 19/XII weak paretic, 19/XII 0.5 g oryzanin, 20/XII killed.
6	40'	35'	0.179	6' 30"	direct before injection 1.285 killed 1.255	Since 20/XII rice feed, 13/I opisthotonos, reaction lost, 0.5 g oryzanin, 14/I killed.
7	16'	15'	0.140	8'	direct before injection 1.300 killed 1.105	Since 27/XII rice feed, 17/I weak paretic, 0.5 g, oryzanin, 19/I killed.
8	13'	17'	0.115	11' 30"	direct before injection 1.22 killed 1.12	Since 26/XII rice feed, 27/I weak paretic, 0.5 g oryzanin, 28/I killed.
9	—	18'	0.106	10'	direct before injection 1.36 killed 1.31	Since 14/I rice feed, 2/II weak paretic, 0.5 g oryzanin, 3/II killed.

In the rest of the example a large dosis (0.5 g) of vitamin-B was given one day, and the next morning, the animals were killed.

The hypertrophy was not so much reduced in No. 5. 6. 7, though their coferment contents showed a tendency to return to the normal state. But in examples 8 and 9, both were brought nearly to the normal value. Though not all of the examples afforded a concordant result, yet we can well conceive that in the majority of the cases studied, the effect of vitamin-B has some indirect concern with the carbohydrate combustion in the animal body. One of the most interesting features in the above experimental facts is the prompt response of the enlarged cortex of the adrenal gland, as in the case of No. 8 and 9. It seems very plausible that in these instances Vitamin-B caused a discharge of coferment from adrenal gland.

#### EXPERIMENT V.

The importance of adrenal cortex to the maintenance of life has been emphasized by many investigators, though the real chemisms involved have been little elucidated. The first obvious symptom due to the removal of the cortical portion of the adrenal gland is the weakness of muscle. This fact might be explained by assuming that the cortical portion produces a coferment important for the carbohydrate metabolism, which is fundamental in muscle energetics.

In the case of B-avitaminose, the increase of this coferment content occurs as is shown in the foregoing experiment. This seems to be contradictory to the diminished efficacy of the striated or heart muscle of the avitaminotic fowls. Perhaps, this is not the real increase of the coferment but rather the accumulation owing to the hindernis of the discharge, which is controlled by vitamin-B as is shown in the above experiment. Coferment itself has no apparent action of vitamin-B, because the injection of the active coferment to the avitaminotic animal can not bring about prompt rescue. But in the case of feeding of the animals on polished rice with the extract of suprarenal cortex or with tissue itself, the onset of the avitaminotic symptoms was postponed; the

oxidative activity of striated and heart muscles and the coferment content of suprarenal cortex were normal. The addition of other tissues and organs has failed to reveal any beneficial effect. It might be justified, therefore, to conclude that a substance which acts as a coferment and is contained in suprarenal cortex has a certain bearing with vitamin-B.

The experimental results of the feeding of fowls on polished rice with various tissues are summarised in table V. VI. VII. The tissue was given in powdered form, 0.3 g. per day. The suprarenal extract, also in powdered form, prepared as described before was given 3.0 mg per day.

TABLE V.

The decolorization time of red muscle extract of vitamin-B deficient fowls fed on several organ preperates.

No.	Suprarenal cortex extr. + rice	Suprarenal cortex powder + rice	Kidney powder + rice	Liver powder + rice	Brain powder + rice
1	14'	17'	40'	40'	35'
2	14'	14'	32'	20'	33'
3	13'	17'	35'	28'	40'
4	15'	12'	33'	38'	35'
5	12'				
Average	13' 30"	15'	35'	31' 30"	37' 30"

TABLE VI.

The decolorization time of heart muscle of fowls, which fed on various organ preperates plus polished rice.

No.	Suprarenal cortex extr. + rice	Liver powder + rice	Brain powder + rice	Kidney powder + rice
1	13'	25'	26'	26'
2	16'	26'	25'	40'
3	13'	38'	25'	33'
4		33'	53'	
Average	14'	31'	32'	36'



TABLE VII.  
The effect of the polished rice feeding with various tissues and organs upon  
the coferment content of suprarenal gland.

No.	Acute hunger fowls		Suprarenal cortex extract + rice		Suprarenal cortex powder + rice		Kidney powder + rice		Liver powder + rice		Brain powder + rice	
	Weight of supra-renal gland per kg. body weight (g)	Time of decolorization	Weight of supra-renal gland per kg body weight (g)	Time of decolorization	Weight of supra-renal gland per kg body weight (g)	Time of decolorization	Weight of supra-renal gland per kg body weight (g)	Time of decolorization	Weight of supra-renal gland per kg body weight (g)	Time of decolorization	Weight of supra-renal gland per kg body weight (g)	Time of decolorization
1	0.138	9'	0.082	10'	0.123	10'	0.151	6' 30"	0.143	5' 30"	0.163	6'
2	0.138	10'	0.99	10'	0.084	11"	0.171	5' 30"	0.152	5' 30"	0.167	6'
3			0.106	10'	0.102	10'	0.153	5' 30"			0.154	5' 30"
Average	0.138	9' 30"	0.096	10'	0.103	10' 20"	0.158	5' 30"	0.148	5' 30"	0.163	5' 50"

## RESUMÉ.

1. The content of  $H_2$ -donator (a sort of hexosephosphate) of the B-avitaminised fowls was found to be much reduced in comparison with those under normal conditions or acute inanition by testing with the methylenblue technique of Thunberg.

2. The candiolin-dehydrogenase activity of the heart muscle of vitamin-B deficient fowls was also reduced highly.

3. On vitamin-B deficient diet, the hypertrophy of suprarenal cortex accompanied with the accumulation of the coferment for candiolindehydrogenase was observed.

4. The application of vitamin-B preparation to the avitaminised fowls brought about a prompt restoration to the normal state in every respect of the above disturbances, unless the animal was too much exhausted.

5. The addition of suprarenal cortex to the vitamin-B deficient diet delayed the onset of avitaminose, which effect was not observed with other tissues, such as liver, kidney and brain.

The author is deeply indebted to Professor K. Kodama and to Professor R. Kaneko for their kind advice throughout this investigation.

## REFERENCES.

- Abderhalden, E. (1920): *Archiv f. die gesam. Physiol.*, **185**, 141  
" (1921): " " " " **187**, 80.  
Drummond, J. C. and Marrian, G. F. (1926): *Bioch. Jl.*, **20**, 1229.  
Hess, W. R. (1921): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **117**, 288.  
Kodama, K. (1932): *Jl. of Biochem.*, **15**, 473.  
McCarrison, R. (1920): *Proc. Roy. Soc. London*, **91**, 103.  
Nagai, S. (1932): *Jl. of Biochem.*, **16**, 371.  
Tsukano, M. (1932): *Jl. of Biochem.*, **15**, 477.  
Tokumitsu, M. (1918): *Nisshin Igaku*, **7**, 1099.





## STUDIES ON BIOLOGICAL REDUCTION.

### VII. On the Oxidation of Lactic Acid in the Heart Muscle of Vitamin-B Deficient Fowls.

By

TADAWO SAKAI.

*(From The Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, Kyushu Imperial University, Fukuoka. Direktor: Prof. Dr. K. Kodama.)*

(Received for publication, April 23, 1934)

It has been proved by many investigators that lactic acid content in tissues and blood of vitamin-B deficient animals increases. Collazo and his fellow-workers (1926, 1931) observed that the lactic acid content in the blood of B-avitaminised pigeons was raised twice that of normal blood. Tanaka (1928) confirmed this result on blood and muscle of dog, though it failed on the liver.

Hayazaka (1929) found that the content of lactic acid in the blood of beriberi patients was higher than normal, and that when 3 grams of sodium lactate as 0.03 percent solution was injected intravenously, it took a longer time to disappear from blood in the case of beriberi. He ascribed this disappearance to the synthesis of glycogen from lactic acid.

Kinnersley and Peters (1930) determined the lactic acid content in the brain of vitamin-B<sub>1</sub> deficient pigeons and found that an accumulation of lactic acid in the brain occurred.

Fisher (1931) observed that the lactic acid content in liver, heart and breast muscle of vitamin-B deficient pigeons is extremely high, especially after hard work. He said that in normal pigeons, lactic acid produced during hard work can be discharged rapidly out of the tissues, whereas this is not the case in avitaminised birds.

In this connection, Findlay's (1921) work is worth referring to. He reported that in liver of vitamin-B deficient animals glyoxalase, which converts methylglyoxal into lactic acid, is highly decreased in comparison with normal liver. Accordingly, Moller

(1931) believed that B-avitaminose may be produced by the intoxication of methylglyoxal.

All of the above enumerated works coincide on the increase of lactic acid in B-avitaminised animals. But none touched on the problem how the oxidation of lactic acid is affected in them. This is partly ascribed to the poverty of our knowledge on the essential nature of lactic acid breakdown. Quite recently St. Györgyi gave very interesting information that a special coferment is necessary for lactic acid oxidation. It was proved by Yamamoto in this laboratory that this coferment is abundant in the suprarenal cortex, as well as in heart muscle. Furthermore Yamamoto indicated that the ferment involved is a dehydrogenase in the sense of Wieland, which is active only in the presence of this coferment.

In this communication, the author presents the result of an experiment carried out in order to elucidate how the activity of this lactodehydrogenase is altered in B-avitaminose.

#### EXPERIMENTALS.

Fowls were fed on polished rice and water for a few weeks. When the symptoms of B-avitaminose became obvious the animal was killed by decapitation, bled as much as possible, and the heart was removed and minced by the scissors. These fragments of heart muscle were washed thoroughly for 3 hours in running water, and squeezed between filter papers and weighed. Then this was made into paste with sea sand in a mortar and a sufficient amount of *M*/15 phosphate buffer (PH 7.38) was added so as to make 10% suspension of the muscle.

As the coferment, the preparation isolated from fresh pig heart muscle by the method described by Banga and Szent-Györgyi (1932) was used as 0.1 percent watery solution.

As donator, *M*/10 watery solution of sodium lactate was used.

The experiment was carried out as described in the foregoing paper. Namely, into the vacuum-tube of Thunberg were introduced 1.0 cc. of 10.0 percent heart muscle emulsion, 0.5 cc. of the coferment solution, 1.0 cc. of sodium lactate solution and 2.5 cc.

of  $M/10000$  methylenblue solution. After being evacuated for 2 minutes by a vacuum-pump, the tube was placed in a thermostat kept at  $37^{\circ}\text{C}$  and the time of decolorization was measured.

As the controls, the heart muscle of normally nourished animals or those under acute inanition were tested.

The results are summarised in Table I.

TABLE I.

The decolorizations time in minutes of the heart muscle of variously treated animals.

No.	Normal fowls	Acute hunger	Vitamin-B deficient
1	8'	12'	60'
2	8'	15'	60'
3	8'	12'	45'
4			60'
5			60'

The above table reveals clearly that the decolorization time of the heart muscle emulsion of normal fowls shows only 8 minutes, but that of vitamin-B deficient fowls 45–60 minutes, and that of acute hunger 12–15 minutes.

To raise additional evidence, the author measured the redox-potential of heart muscle of vitamin-B deficient fowls, using the vacuum electrode vessel of Kodama and Dixon, the details of which have been described by Tsukano (1932).

Into the main reaction vessel were introduced 4 cc. of 10,0 percent of heart muscle emulsion, 4 cc. of  $M/10$  solution of sodium lactate, and 2 cc. of  $M/10000$  methylenblue solution and into the side compartment 2.0 cc. of 0.1 percent coferment solution.

As the reference electrode, that of quinhydrone with the acetate buffer ( $\text{pH } 4.6$ ) was used.

After the connection between two electrodes was ensured by means of an agar salt bridge, the whole vessel was evacuated for 4 minutes by use of a vacuum-pump, and then was immersed in a thermostat regulated at  $37^{\circ}\text{C}$ . When the contents reached the temperature of the thermostat, E.M.F. of this chain was measured

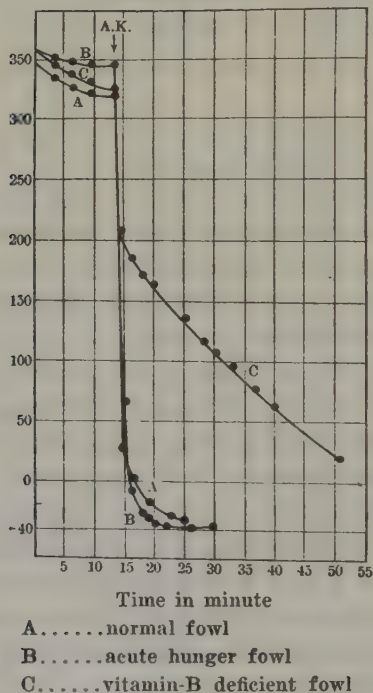


with the Leed and Northrup's potentiometer every 3 minutes. When this attained to constant value, the side compartment was overturned and its content was emptied, mixed well by shaking, and the following change in the potential was traced. As the control, a similar experiment with heart muscle emulsion of normal fowls was performed.

The results are indicated in Fig. 1.

Fig. 1.

The redox potential time curve of heart muscle emulsion of normal, of acute hunger, and of vitamin-B deficient fowls.



As is expected, in the case of the normal fowl, the potential showed a sudden drop from  $E_h + 325.5$  m.v. to  $-10.5$  m.v. within 3 minutes after the addition of the cofactor (A.K.).

In the case of acute hunger, nearly the same run of the redox potential curve was observed.

But in the case of vitamin-B deficient fowls, the drop of the potential is much slower, taking 15–35 minutes for the fall of 300 m.v.

We can conclude, therefore, that in B-avitaminose, the activity of lactodehydrogenase of the heart muscle is severely injured. It is one of the most common symptoms in beriberi that a sudden collapse due to cardial disfunction occurs. Perhaps this is caused by the accumulation of lactic acid due to the reduced activity of this ferment.

#### SUMMARY.

The fact that lactodehydrogenase in the heart muscle of the fowls fed on polished rice is severely injured, is proved by methylenblue technique and redox potential measurement.

The author is deeply indebted to Professor K. Kodama and to Professor R. Kaneko for their kind advice throughout this investigation.

#### REFERENCES.

- Banga, I. and Szent-Györgyi, A. (1932): *Biochem. Zeitschr.*, **246**, 203; **274**, 216.  
Collazo, J. A. and Morelli, E. (1926): *Journ. de physiol. et de pathol. gen.*, **24**, 76.  
Collazo, J. A. and P-Suner-Bayo (1931): *Bioch. Zeitschr.*, **238**, 335.  
Fisher, R. B. (1931): *Biochemic. Jl.*, **25**, 1410.  
Findlay, G. M. (1921): *Biochemic. Jl.*, **15**, 104.  
Hayazaka, E. (1929): *Tohoku Jl. of exper. Medicine*, **14**, 283.  
Kinnersley, H. W. and Peters, R. A. (1930): *Biochemic. Jl.*, **24**, 711.  
Tanaka, K. (1928): *Folia Endocrinica Japonica*, **4**, 858.  
Tsukano, M. (1932): *Jl. of Biochem.*, **15**, 477.  
Vogt Moller, P. (1931): *Bioch. Zeitschr.*, **233**, 248.





## BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

(Directed by Assistant Prof. H. Masamune.)

### V. A Micro Method for Quantitative Estimation of Chondroitin Sulfuric Acid in Cartilage.

By

TORAZO MIYAZAKI.

(From the Medico-chemical Institute, Kyushu Imp. University,  
Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)

(Received for publication, April 23, 1934)

Winter (1932) is so far the only author, who undertook the quantitative analysis, in the strict sense, of chondroitin sulfuric acid in cartilage. He took as material the cartilage of the nasal septum from hog and tried to evaluate the amount of the acid from the reduction power of the hydrolysate of cartilage, the contents of sulfuric acid and acetic acid in it, and the quantity of chondroitin nitrogen which is not precipitated out by phosphotungstic acid. Theoretically, any of these three components of the hydrolysate can be the measure for determination of the acid. But the analysis of them is not recommendable for a micro-method. In order to determine the quantity of the aminosugar, Winter applied the Zuckerkandl-Messiner-Klebermass method (1931) to the hydrolysate obtained by boiling cartilage in hydrochloric acid over night, but the colour development did not reach that calculated and so he claimed that by hydrolysis the theoretical amount of products can not be gained from the chondroitin sulfuric acid, since, on one hand, simultaneous decomposition occurs when strong acid is used, and, on the other, weak acid does not suffice to set free all the aldehyde group of the molecule.

Under the conditions described below, however, we find that the acid can be split up completely without any further change of the products. The depth of colour of the hydrolysate, developed by the Zuckerkandl-Messiner-Klebermass method, corresponds exactly to the content of the aminosugar, and furthermore,

no other components of the cartilage were found to effect the colour depth.

Based on these findings, an exact colorimetric micromethod of determining chondroitinsulfuric acid was developed, the details of which are given in this paper.

#### REAGENTS.

1. 95% alcohol.
2. 1 *n.* HCl.
3. 5% sod. methylate in methanol.
4. acetic anhydride.
5. absolute alcohol.
6. 30% KOH-sol.
7. Ehrlich's reagent.
8. Artificial reference standard for colorimetry (Kawabe (1934)).

#### PROCEDURES.

##### 1. *Treatment of the cartilage.*

Cartilage separated from the perichondrium is washed with water, minced, and kept in 95% alcohol for 24 hours. Then it is removed from alcohol by pressing between clean papers, dried in vacuo over  $\text{CaCl}_2$ , and finally powdered in a mortar.

##### 2. *Analysis.*

5 mg of the dry cartilage powder is weighed into a big glass tube for hydrolysis and heated with 10 cc. 1 *n.* HCl in a boiling bath under reflex condensor. After the lapse of 30 minutes, the hydrolysate is cooled under running water and transferred into a small porcelain dish. The tubes are rinsed out with two 1 cc. portions of water, the washings are added to the liquid in the dish, and the whole is evaporated on the boiling bath. After being dried and then cooled in the air, the residue is treated according to Zuckerkandl and Messiner-Klebermass as follows:

1 cc. of sodium methylate sol. is pipetted into the dried residue and mixed well. Then it is cooled on melting ice in a beaker and added to with 0.3 cc. of acetic anhydride in drops. After 1 minute,

the mixture is dissolved in 1 cc. water and poured into a big test-tube quantitatively with the aid of two 0.75 cc. portions of water. It is added to furthermore with 1 cc. of absolute alcohol and 0.5 cc. of 30% KOH, boiled over a free flame for exactly 8 seconds, and cooled quickly in the ice water. When cooled, it is added to, finally, with 3 cc. of the Ehrlich's reagent and shaken for 5 minutes. The colour depth is compared with the artificial standard of Kawabe set at 15 mm.

### 3. Calculation.

$$\text{Chondroitinsulfuric acid (g) in 100 g of cartilage} = \frac{\text{reading of the unknown}}{15.3} \times \frac{936}{430} \times 20.$$

The molecular weight of the acid and the chondrosamine content in it was calculated from the formula of Levene (1922).

### NOTES.

#### I. Preparation of sodium chondroitinsulfate and the composition of the specimen.

It was prepared according to Jorpes (1929) from the nasal septum of whale with a minor modification (The duration of extraction with 2% NaOH solution was shortened to 5 hours). The yield amounted to 5% of the dry powder of cartilage. The purification was performed as follows: The sample was dissolved in 2% NaOH sol. in the proportion of 1 g. to 10 cc. and filtered, after being slightly acidified with acetic acid. The filtrate was treated with two volumes of 95% alcohol and the precipitate which came out was dried up to a constant weight in vacuo over  $\text{CaCl}_2$ .

#### Analysis:

N (by the Kjeldahl method):

Substance mg	N	
	mgm	%
0.2488	6.02	2.42
0.2000	4.80	2.40
0.3126	7.63	<u>2.44</u>
	average	2.42



H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-S (by the Folin method (1905-06):

Substance gm	S	
	mgm	%
0.3028	15.14	5.00
0.4153	21.09	5.08
0.2825	14.29	5.06
	average	5.05

*Glucuronic acid* (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>):

It was determined from the furfural quantity distilled according to Händel (1924). 0.1 gm. of the substance contained 41.01 mg (the average of 41.88 and 40.14 mg).

*Aminogroup:*

50 mgm substance were dissolved in 10 cc. 0.1 *n* HCl and hydrolysed for 1 hour in a boiling bath, cooled and titrated with 0.02 *n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution after addition of 20 cc. of 0.1 *n* NaOH and 1 cc. formaldehyde (35%) solutions, using phenolphthalein as an indicator. The blank experiment on the reagents were carried out under exactly the same conditions and corrections made accordingly. The used quantity of 0.02 *n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> amounted to 4.4 cc. on the average (4.2, 4.4 and 4.5 cc.) 100 g of the specimens contained 2.816 gm. ( $16 \times 0.02 \times 4.4 \times 100 / 1000 \times 0.05$ ) of-NH<sub>2</sub> which correspond to 2.464 gm. *N*.

*Acetyl-radical:*

100 mgm of the substance were heated with 20 cc. 0.1 *n* HCl for 1 hour in the boiling bath under the reflex condensor. It was then cooled, neutralized with 0.1 *n* NaOH solution, acidified with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10% solution) and finally submitted to the steam-distillation. The distillate was titrated with 0.02 *n* NaOH sol. using phenolphthalein as an indicator. The blank test was carried out by omitting the substance. The titrated quantity was 8.65 cc. (average of duplicate analyses: 8.6 cc. and 8.7 cc.), namely acetyl radical cal. as CH<sub>3</sub> COOH amounted to 10.38% ( $= 60 \times 0.02 \times 8.65 \times 1000 / 1000$ ) with respect to the substance.

As the sulfate, acetyl and also the aminogroup, from which the stabilizing acetylgroup has been removed, may be split off to some extent during the course of the preparation, the glucuronic acid content is to be chosen as the measure of calculating the molecular composition of the specimen. The glucuronic acid, which was found by analysis corresponded to 41% of the substance, while it should be 37.9% if calculated from Levene's formula  $C_{28}H_{40}O_{29}S_2N_2Na_4$  (mol. weight=1024). The fact means that some other components of the molecule have been either decomposed or removed. As the ratio of the total N to the  $NH_2-N$  is 0.984 ( $=2.42:2.46$ ) and that to the acetic acid is 0.999 ( $\frac{2.42}{14}:\frac{10.38}{60}$ ),

the total nitrogen, of the specimen belongs to the aminosugar and entirely combined with the acid radical. The acetylaminosugar corresponds to 38.2% ( $=2.42\% \times \frac{221}{14}$ ) of the sample if calcul.

as  $C_8H_{15}O_6N$ . (theoretically  $2.73\% \times \frac{221}{14}=43.1\%$ ). The carboxyl of the glucuronic acid and all the remaining sulfate rest is to be considered as combined with sodium, so that the quantity of sulfate residue plus sodium as  $Na+SO_4H$  can be calculated as below.

$$41.01 \times \frac{23}{194} + \frac{120.06 (=NaHSO_4)}{32 (=S)} \times 5.05\% = 4.86 + 18.94 = 23.80\%$$

(For the perfect molecule:  $37.89\% \times \frac{23}{194} + \frac{120.06}{32} \times 6.24\% = 27.90\%$ .)

The results are summarised as follows:

	Theoretical %	Found in the specimen %
Glucuronic acid as $C_6H_{10}O_7$	37.9	41.0
Acetylchondrosamine as $C_8H_{15}O_6N$	43.1	38.2
Sum of Na combined with glucuronic acid and $NaSO_4H$	27.9	23.8
	108.9	

The quantity of the sulfate residue in the specimen does not coincide with the aminosugar and the ratio of  $\text{SO}_4\text{NaH}$  to the latter (as  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_6\text{N}$ ) is 0.50 ( $=18.94/38.2$ ) in comparison to 0.54 ( $=120/221$ ) when they are present in the equivalent amount. Consequently the sugar residue corresponding to 92.6% ( $=0.5/0.54$ ) of the acetylchondrosamine is combined with the sulfate remainder.

The perfect molecule of sodium chondroitin-sulfate is constructed from these components by losing  $5\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}$  ( $=92.$ ), and the latter (92) correspond to 8.9% of the gram molecular weight of the sodium salt. But as the composition of the present specimen is not theoretical, the total sum of the components, from which  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{H}$  lost in building up the molecule are subtracted, does not reach 100% but is less by 5.1% as calculated below:

$$100 - \left[ 41.0 \left( 1 - \frac{18 + 2}{388} \right) + 38.2 \left\{ 1 - \frac{18}{221} (1 + 0.926) \right\} + 23.8 \right] = 100 - 94.9 = 5.1\%.$$

This deficit may be either mere impurity or sugar-rest produced from the aminosugar by losing the amino- and sulfate rests. If it is assumed to be the latter, i.e. galactose or talose, it ought to give the free hexose amounting to 5.7% [ $=5.1\% \times 180 (= \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) / 162 (= \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 - \text{H}_2\text{O})$ ] of the sample, when hydrolysed.

## II. Preparation of chondrosamine chlorhydrate from sodium chondroitin sulfate.

It was prepared according to the principle of the Levene method. (1916) as follows:

4 gm. of sodium chondroitinsulfate was heated with 30 cc. of 20%  $\text{HCl}$  sol. under refluxcondensor in the boiling bath. Stannous and barium chlorides used by Levene as catalysts for hydrolysis were omitted. After the lapse of 12 hours, the mixture was cooled, filtered, and concentrated under reduced pressure at a temperature below  $50^\circ\text{C}$ , after being treated with charcoal. The syrupy residue thus obtained was then dried in vacuo over  $\text{P}_2\text{O}_5$  and then taken up in a small volume of  $\text{CH}_3\text{OH}$  and shaken with charcoal. It was filtered and added to cautiously with ether in drops until the liquid became slightly turbid. Crystallisation proceeded very slowly.



Crystals, needles and yield, 0.3 gm. Recrystallisation was conducted according to Levene (1923). Analysis:

N by the Kjeldahl method:

substance 50 mgm, found: 3.15 mgm (6.3%), cal: 6.5%.

Cl. (by the Volhard-Arnold method)

substance 50 mg, found: 15.6%, calc: 16.47%.

*III. The reduction power of the chondrosamine chlorhydrate and galactose and the colour reaction of the former.*

A measured quantity (0.1 mg—0.3 mg) of the chondrosamine chlorhydrate was dissolved in 12 cc. water and its power of reduction on ferricyanide was estimated by the method described by Masamune (1933).

TABLE I.

Chondrosamine HCl taken for analysis mgm	0.005 <i>n</i> ferricyanide sol. reduced cc.
0.1	0.46
0.2	0.92
0.3	1.38

The molecular reduction power is 46/52 times that of glucose and equal to glucosamine chlorhydrate.

The reduction power of galactose was found equal to glucose (determined with 0.1, 0.2 and 0.3 mgm) and 0.1 mg reduced 0.6 cc. of 0.005 *n* ferricyanide solution (conf. Mesamune 1933).

As regards the colour reaction, a measured volume of 100 mgm p.c. solution of chondrosamine chlorhydrate was evaporated and the colour depth developed by the Zuckerkandl-Messiner-Klebermass method was compared with that of glucosamine chlorhydrate as the standard. The layer of the standard sol. was set at 15 mm in height.

The colour depth of the chondrosamine is 0.98 (=15/15.3) times that of glucosamine as the accompanying table shows.

TABLE II.

Substance taken for analysis mgm	Reading in the colorimeter mm	Ratio of the colour depth to that of 1 mgm substance
1	15.3	1
3	5.1	3.0
5	3.1	4.94

IV. *Hydrolysis of chondroitinsulfuric acid by HCl.*

A measured quantity (1-5 mgm) of the sodium salt was dissolved in 10 cc. of 1 *N* HCl and heated in the bath under reflux-condensor, then cooled, neutralized with 1 *N* NaOH solution and made up to 50 cc. with water. Next 5 cc. of it was pipetted into a big test tube, made up to 12 cc. with water, and the power of reduction on ferricyanide was estimated as above noted. Table III shows the results.

TABLE III.

Substance taken		Quantity of 0.005 <i>N</i> ferricyanide sol. red. after the hydrolysis					
For hydrolysis mgm	For analysis mgm	5	15	30	60	120	180 min
		cc.	cc.	cc.	cc.	cc.	cc.
1	0.1	0.24	0.35	0.42 (95.4%)	0.40	0.40	0.39
2	0.2	0.44	0.64	0.82 (94.3%)	0.82	0.80	0.75
3	0.3	0.68	0.93	1.23 (94%)	1.14	1.16	1.14
4	0.4	0.87	1.24	1.60 (92%)	1.60	1.58	1.48
5	0.5	1.16	1.72	2.06 (94.5%)	2.04	1.98	1.95
				94.04% (average)			

The reduction power reaches the maximum at the 30th minute

from the commencement of hydrolysis, remains constant till the 60th min. and begins to diminish at the 120th minute.

The reduction power of the substance when totally hydrolysed, may be calculated from the composition of the specimen enumerated above.

The content of acetylchondrosamine (23.8%) corresponds to 37% ( $= 38.2 \times 215/221$ ) in terms of chondrosamine chlorhydrate, and 0.1 mg glucuronic acid reduces 0.56 cc. of the ferricyanide solution (Masamune 1933). If 5.1% of the substance is assumed to be composed of galactose and the quantities of the reduced ferricyanide solution are multiplied by the amounts of the corresponding sugars and summed up, the total reduction power of 0.5 mg substance would be 2.18 cc. in terms of the ferricyanide solution reduced.

$5 \times (0.46 \times 0.37 + 0.56 \times 0.41 + 0.6 \times 0.06) = 0.85 + 1.15 + 0.18 = 2.18$ . Those of 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 mgm of the substance are 0.44, 0.87, 1.31 and 1.74 cc. respectively. As is indicated in table III, the reduction power at the maximum is less than that calculated by 6%. This corresponds nearly to the reduced quantity by the assumed galactose portion ( $0.18/2.18 = 0.083$ ). Probably this portion is nonreducible impurity, because under the conditions of the mination of the aminosugar by the Zuckerkandl-Messiner-Klebermass method.

From the above results, the writer chose 30 minutes for determination of the aminosugar by the Zuckerkandl-Messiner-Klebermass method.

#### V. *The depth of colour by chondroitinsulfuric acid after being hydrolysed under the conditions chosen.*

A measured quantity of the sod. chondroitinsulfate was treated with HCl as described, and the hydrolysate was cooled after 30 min. of heating and transferred into a porcelain dish quantitatively by rinsing out the rest with two 1 cc. portions of water. The hydrolysate plus the washings were evaporated to dryness on the bath and treated further as described. The artificial standard of Kawabe was applied for colorimetry, being set at 15 mm.



TABLE IV.

Substance analysed mgm	Reading in the colorimeter mm	Quantity of chondrosamine chlorhydrate		
		Found		Calc.
		mgm	%	mgm
1	38.8	0.39	105.4	0.37
2	19.4	0.79	106.4	0.74
3	13.0	1.18	106.3	1.11
4	10.0	1.53	103.4	1.48
5	7.8	1.96	105.9	1.85

The quantity of chondrosamine chlorhydrate was calcul. from the equation:

$$\text{quantity of chondrosamine chlorhydrate (mgm)} = \frac{\text{reading of the unknown}}{15.3}$$

The amount found of chondrosamine chlorhydrate is larger than that calculated by from 3.4 to 6.4%, which is to be regarded as the experimental error.

*VI. Chondrosamine is recovered quantitatively when it is added to the dry powder of cartilage in the form of chondroitinsulfuric acid hydrolysed.*

The cartilage from the nasal septum of whale was dried and powdered as described, and a measured quantity (1 mgm–5 mgm) of sodium chondroitinsulfate was added to it, and chondrosamine was estimated after being hydrolysed as described.

(sod. chondroitinsulfate used in this case was newly prepared and the composition is somewhat different from that of the specimen in the experiments above.)

As seen in Table V., added chondrosamine is recovered quantitatively.

TABLE V.

Cartilage powder taken mgm	Sod chondroitinsulfate added. mgm	Chondrosamine in terms of the chlorhydrate.			
		Reading mm	mgm	Recovered mgm	percentage of the recovered quantity
5	0	16.5	0.93		
5	1	11.6	1.32	0.39	99
5	2	9.	1.70	0.77	98
5	3	7.3	2.10	1.17	99
5	4	6.2	2.47	1.54	98
5	5	5.3	2.89	1.96	99
0	2	19.3	0.79		

*VII. Whether or not the conditions for perfect hydrolysis of chondroitinsulfuric acid are sufficient for the analysis of it in cartilage.*

1 mgm of the powder of cartilage (from the nasal septum of a whole), on one hand, was hydrolysed with 8 cc. of 1 *N* HCl solution and the reduction power of the hydrolysate was estimated after neutralizing with 4 cc. of 2 *N*. NaOH and adding 4 cc. of 0.005 *N* ferricyanide solution as mentioned. On the other hand, 5 mgm of the same material were hydrolysed with 10 cc. of 1 *N* HCl and the aminosugar were determined by colorimetry. The reduction power and the colour development both reached the maximum at the 30th min. from the commencement of hydrolysis. This agrees with what was expected from the experiment of hydrolysis of the acid itself. The maximal value of chondroitinsulfuric acid calculated from the colorimetric reading was checked by analysis of sulfate residue in the cartilage powder (Folin method 1905-06) using 500 mgm of the powder. The ignited BaSO<sub>4</sub> weighed 99.7 mgm which corresponds to 40% (=99.7 mg × 936 × 200/233,43 × 2) in chondroitinsulfuric acid. This proves that the maximal value by colorimetry is quite satisfactory (Table VI).

TABLE VI.

Time interval of hydrolysis  min.	Quantity of 0.005 n ferri- cyanide sol. red. by the hydroly- sate of 1 mgm cartilage powder cc.	Chondrosamine-HCl in 5 mgm of cartilage powder by colorimetric reading		Chondroitinsul- furic acid (%) calc. from colorim. reading.
		mm	mgm	
15	1.81	18.	0.85	36.95
30	1.88	16.	0.96	40.85
60	1.87	16.	0.96	40.85
120	1.87	17.3	0.88	38.45
180	1.85	19.7	0.78	33.85
240	1.84	20	0.77	33.26
300	1.81	20.5	0.75	32.45

## SUMMARY.

Chondroitinsulfuric acid can be estimated quantitatively in such a small quantity of cartilage as 5 mgm. of the dry powder by means of the Zuckerkandl-Messiner-Klebermass method.

The writer is indebted to Professor K. Kodama for criticisms, to Dr. I. Kubo, Professor of Otorhinolaryngology for continuous encouragement, and to Assistant Professor H. Masamune for kind direction in the course of this work. The writer acknowledges gratefully also the kindness of Dr. M. Moriyama in the analysis of glucuronic acid.

## REFERENCES.

- Folin, O. (1905-06): J. biol. chem., 1, 131.  
 Händel, M. (1924): Z. f. ges. exp. Medizin, 42, 178.  
 Jorpes, E. (1929): Bioch. Z., 204, 354.  
 Kawabe, K. (1934): J. of Bioch., 19.  
 Levene, P. A. (1922): The Rockefeller Institute for medical Research  
 Monograph. No. 18, 104.  
 Levene, P. A. (1916): J. biol. chem., 26, 143.  
 " (1923): " 57, 337.  
 Masamune, H. (1933): J. Biochem., 18, 259.  
 Winter, W. (1932): Bioch. Zeits., 246, 10.  
 Zuckerkandl, F. and Messiner-Klebermass, L. (1931): Bioch. Z.,  
 236, 19.

## BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

(Directed by Assistant Professor H. Masamune).

### VI. The Quantitative Observation of Chondroitinsulfuric Acid in Cartilage and Bone.

By

TORAZO MIYAZAKI.

(From the Medico-chemical Institute, Kyushu Imperial University, Fukuoka.  
Director: Professor K. Kodama.)

(Received for publication, April 23, 1934)

This work will illustrate in what degrees chondroitinsulfuric acid is distributed among various parts and kinds of cartilage, the variation of its content along with growth and the appearance of it in bones in cases of rickets. No attempt seems to have been tried as yet to clarify chemicoanalytically these relationships.

#### METHODS.

Chondroitinsulfuric acid was estimated by the procedures already communicated (Miyazaki 1934). The methods of treating bone for analysis will be described later.

The reduction power after acid hydrolysis of cartilage was determined also for comparison as follows: 1 mg of the dried powder was heated with 8 cc. of 1 n HCl sol. under reflex condenser in the boiling bath. The hydrolysis was continued for 30 minutes for which duration chondroitinsulfuric acid is split up perfectly and the reduction power reaches the maximal value. The mixture was then cooled under the tap water, and neutralized with 4 cc. 2 n NaOH. The reduction power was estimated by following the procedures previously communicated (Miyazaki 1934). Chondroitinsulfuric acid was calculated from the results by dividing the latter with the total sum of reduction powers of its components. As 0.1 mg of glucuronic acid reduces 0.56 cc. of 0.005 n ferricyanide sol., an equal quantity of chondrosamine chlorhydrate 0.46 cc. and 1 mgm chondroitinsulfuric acid corresponds to 0.415 mgm



(=388/936) of glucuronic acid and to 0.459 mgm (=430/936) of chondrosamine chlorhydrate, the amount of chondroitinsulfuric acid in 100 gm. cartilage powder is derived from the following equation, provided that the total reduction of the cartilage hydrolysate is assumed entirely due to the components of the chondroitinsulfuric acid.

$$\frac{\text{gm. chondroitinsulfuric acid in}}{100 \text{ gm. of cartilage powder}} = \frac{x}{5.6 \times 0.415 + 4.6 \times 4.59} \times 100.$$

$x$  is the quantity of 0.005 n ferrieyanide solution in cc. reduced by the cartilage powder hydrolysed.

#### EXPERIMENTS.

##### *A. The content of chondroitinsulfuric acid in various kinds of cartilage.*

A cartilage as a whole was taken from a grown-up but not old animal which was killed in the slaughter house, or in the laboratory and the chondroitinsulfuric acid content was estimated on the dry powder.

Table I indicates that the cartilage contains various amounts of chondroitinsulfuric acid according to its kind. The acid is richest in the hyaline cartilage (about 36.03–39.31% of the dry powder by colorimetry) and poorest in the fibrocartilage (14.78–15.67%). The elastic cartilage lies between these two (25.87–29.99%). No marked difference exists among individuals, species and localisations.

Costal cartilage belongs to the exception and the acid content is low in comparison with the hyaline cartilages enumerated in Table I. It is because the ossification begins here very early. As will be seen later (table II), the soft part of it where ossification has not yet taken place is as rich in the acid as the other hyaline cartilages are.

##### *B. The distribution of chondroitinsulfuric acid in the various parts of the hyaline cartilage.*

The hyaline cartilage converts into bone with the growth. The ossification begins from the posterior part in the cartilage of nasal

TABLE I.

Kind of cartilage	Localisation	Animal	Chondroitinsulfuric acid (%) in the dry powder								
			a: by colorimetry	b: by the red. method	c: b-a						
Hyaline c.	Nasal septum	ox	no. 1 <sup>1)</sup>	53.59	Average 37.56	36.85	1.26	1.50			
			no. 2	38.99					39.04	0.93	
			no. 3	38.11							
		horse	no. 1	37.19	38.09	39.06	1.87	1.98			
			no. 2	38.99					41.08	2.09	
		hog	no. 1	36.03	38.16	37.70	1.67	2.09			
			no. 2	39.13					41.08	1.95	
			no. 3	39.31							41.96
		Trachea	ox	no. 1	34.95	36.20	37.70	2.75	2.25		
				no. 2	37.63					39.06	1.43
				no. 3	36.03						
		horse	no. 1	36.49	37.46	37.70	1.21	0.78			
	no. 2		28.42	38.77					0.35		
	Cricoid c.		hog							no. 1	38.42
		no. 2		37.66	39.65	1.99					
		no. 3		38.27			39.24	1.57			
Elastic c.	External ear	ox	no. 1	29.99	27.64	31.20			1.21	1.32	
			no. 2	25.87			26.94	1.07			
			no. 3	27.07							28.75
		horse	no. 1	27.59	27.75	31.88	4.29	3.56			
			no. 2	27.91					30.74	2.83	
		hog	no. 1	28.83	27.52	33.66	4.83	3.05			
			no. 2	26.61					29.51	2.90	
			no. 3	27.11							28.52
		Fibro-cartilage	Intra-articular c. (knee joint)	ox	no. 4	15.53	15.39	16.84	1.31	1.24	
					no. 5	15.25					16.41
		rabbit	no. 1	14.78	15.33	18.62	3.84	3.03			
			no. 2	15.67					17.82	2.15	
			no. 3	15.53							18.62

1) The same member of the same species signifies that the different cartilages from one and the same animal were taken.

septum and from both ends, especially from the posterior in the costal, so that the hardness of the cartilage is not uniform. The writer cut off various parts of a cartilage according to the hardness and estimated the acid (table II).

TABLE II.

Localisation	Animal	Part	Chondroitinsulfuric acid (% in the dry powder)		
			a: by colorimetry	b: by the red. method	c: b-a
Nasal septum	Whale	no. 1 anterior part (soft)	39.42	40.80	1.38
		posterior part (hard)	35.27	36.20	0.93
		no. 2 anterior part (soft)	39.13	40.62	1.49
		posterior part (hard)	35.48	36.36	0.88
Costal cartil.	ox	no. 1 middle part (soft)	34.92	36.94	2.02
		posterior part (hard)	20.52	21.10	0.58
		no. 2 middle part (soft)	36.17	39.15	2.98
		posterior part (hard)	21.79	23.91	2.12
		no. 3 middle part (soft)	35.48	38.93	3.45
		posterior part (hard)	20.52	24.60	4.08

The part where ossification has proceeded contains remarkably less chondroitinsulfuric acid than the remaining.

*C. The content of the acid in cartilage in different periods of growth.*

As material, the whole costal cartilages from rabbits and the cartilage of human nasal septum were chosen. The rabbits were of the same variety, but in various periods of growth, and the nasal septum which were excised from patients in the writer's hospital were intact but deformed.

TABLE III a.  
(Costalcartilage of rabbits)

	Animal	Body weight gm	Chondroitinsulfuric acid (%) in the dry powder		
			a: by colorimetry	b: by the red. method	c: b-a
Group of grown up but not old rabbits	no. 1	2000	23.13	25.91	2.78
	no. 2	1950	24.31	26.35	2.04
	no. 3	1800	23.01	25.63	2.62
Group of rabbits weighing from 1000-1200 gm	no. 4	1200	28.97	32.03	3.06
	no. 5	1050	29.60	32.49	2.89
	no. 6	1000	31.26	32.89	1.63
Group of rabbits weighing from 500-700 gm	no. 7	700	37.23	40.83	3.60
	no. 8	550	37.93	41.94	4.01
	no. 9	500	36.96	40.97	4.01

The content of the acid decreases as the animal grows older. This applies to the human cartilage also, as will be noticed in table III b.

 TABLE III b.  
(Cartilage of the human nasal septum)

			Chondroitinsulfuric acid (%) in the dry powder		
Patient	Sex	Age	a: by colorimetry	b: by the reduction method	c: b-a
no. 1	♀	41	26.18	28.28	2.10
2	♂	37	33.21	35.77	2.56
3	♂	35	33.21	34.72	1.51
4	♂	28	35.98	38.02	2.04
5	♀	24	37.19	38.74	1.55
6	♂	22	35.01	36.58	1.57
7	♂	20	39.41	41.67	2.26
8	♂	19	39.13	39.96	0.83
9	♀	18	39.53	41.73	2.20
10	♂	17	39.13	41.52	2.39



The reduction method always gave higher value than the colorimetry. This is presumably due chiefly to glycogen and also to protein to a minor extent. But the discrepancy is not so marked that this method is available for merely rough measurements.

Although comparison of the differences between the results obtained by both those methods are of little significance, it stimulates some interest that the difference is generally larger in the soft part of the hyaline cartilage than in its hard part (table II) and furthermore in the costal cartilage it appears of rabbits to diminish along with the growth (table III a). These facts coincide with the account of Hoffmann and others (1928) that the glycogen content is poorer in the hard part than in the remaining of the cartilage, and moreover a continuous decrease of it is observed with age.

*D. Quantitative behaviour of chondroitinsulphuric acid in rickets.*

Experimental rickets were produced in young rats and rabbits. The synthetic diets the animals were fed on were prescribed according to Fujimaki (1930):

for rats: yellow corn powder	43 mg
wheat gluten	50 gm
butter	2 gm
Ca CO <sub>3</sub>	3 gm
NaCl	1 gm
yeast	1 gm
for rabbits: bean-curd refuse	85 gm
wheat	10 gm
Ca CO <sub>3</sub>	3 gm
NaCl	2 gm

The animals, both rats and rabbits, became apathetic and the hair lustreless in the beginning of the second week of feeding and 5 of the 9 rats died between the 8th and 13th days.

The rats were killed at the 14th day and the rabbits, at the 21st day from the commencement of rachitic feeding and the bone

was taken out from the thigh. It was bowed and the epiphysis was markedly enlarged in comparison with that of the control animals. There was the softening and the decrease of Ca-Phosphate which was readily noticed when the periosteum was peeled off. The femurs of rats were removed from the periosteum and the rest of the capsule, kept in 95% alcohol for two days, and dried in vacuo over  $\text{CaCl}_2$ . The whole dry bone was then ground in a mortar after being weighed, and submitted to colorimetric analysis, using the whole powder instead of 5 mgm. In the case of rabbits, however, only both heads of the bone were minced after being removed from the connecting tissues, and dried in alcohol for the same period of time, and the analysis was made similarly as cartilage analysis, using 50 mgm of the dry powder. In both cases, the hydrolysate was treated with 0.2 gm. charcoal before being transferred into the porcelain dish, filtered and the charcoal being washed with two portions of 1 cc. water. The filtrate was evaporated together with the washings and treated further, similarly as in cartilage analysis.

As is shown in table IV, in rickets, the acid increases enormously as may be expected from the chondrification of the bone in this disease. It tripled the acid content of the bone head of the rabbit femur.

#### SUMMARY.

1. The chondroitinsulphuric acid of cartilage was estimated and calculated in percentages of dry powder. The results may be summarized as follows:

a) The content of the chondroitinsulphuric acid varies according to the sort of cartilage; namely, the hyaline cartilage of the grown-up but not old animal contains the biggest, the fibrocartilage the smallest amount and the elastic cartilage lies between these two sorts.

The costal cartilage makes an exception, because of early commencement of ossification in it.

b) The soft part of the hyaline cartilage is richer in the acid than the hard ossifying part is.

TABLE IV.  
Chondroitinsulfuric acid in experimental rickets.

Animal		Body weight gm	Femur (weight of the dried bone) mgm	Chondroitin-sulfuric acid (by colorimetry)
Rat	no. 1 (normal)	40		+
	no. 2 "	50		+
	no. 3 "	50	72	+
	no. 4 "	60	75	+
	no. 5 (rachitic)	55		+++ <sup>1)</sup>
	no. 6 "	50		+++ <sup>1)</sup>
	no. 7 "	55	68	+++ <sup>1)</sup>
	no. 8 "	40	60	+++ <sup>1)</sup>
Rabbit			the dry powder taken for analyses mgm	gm in 100 gm of the dry powder
	no. 1 (normal)	600	50	3.61
	no. 2 "	700	"	3.33
	no. 3 (rachitic)	640	"	11.09
	no. 4 "	650	"	10.73
	no. 5 "	680	"	9.87
	no. 6 "	620	"	10.24

Average

3.47

10.48

1) The colour depth corresponded to about  $\frac{3}{4}$  times that developed by 1 mg chondrosamine chlorhydrate.

c) The acid of the hyaline cartilage increases with age; in other words, with the ossification.

2. The acid in question appears in bone in rickets in accord with the process of chondrification.

3. The reduction method may be made use of for measurement of the chondroitinsulfuric acid in cartilage, when not so exact a value is desired. The amount of the dry cartilage powder necessary for this purpose is as small as 1 mgm.

In conclusion, I should like to express my best thanks to Professor K. Kodama for his helpful advice and criticism; to Dr. I. Kubo, Professor of Otorhinolaryngology for encouragement,

and to Assistant Professor H. Masamune for kind direction during the whole course of this investigation.

# REFERENCES.

- Fujikami, Y. Vitamin (1930): Published by Iwanami Shoten, Tokyo.  
 Hoffmann, A., Lehmann, G. u. Wertheimer, E.: *Ach. f. ges. Physiol.*, **220**, 183-193.  
 Miyazaki, T. (1934): *J. of Biochem.*, **20**, 211.





## BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

(Directed by Assistant Professor H. Masamune).

### VII. On an Enzyme which Disintegrates Glucosamine.

By

KINJI KAWABE.

(From the Medico-chemical Institute, Kyushu Imperial University, Fukuoka.

Director: Professor K. Kodama.)

(Received for publication, April 23, 1934)

No enzymic study on glucosamine is as yet seen, although the fact has been confirmed already by many authors that it is broken down not only by bacteria but also in the animal body. The compound is disintegrated gradually when incubated with the tissue suspension, but not if the latter is boiled in advance. The present communication treats of the distribution of the enzyme, or enzyme complex, responsible for this catalysis among various tissues. The details with regard to the chemical change, the end product and so on will be given in a later publication from this Institute.

#### METHODS.

The tissues were taken from an animal after the blood was first drawn by cardiac puncture in order to obtain the sample for the experiment and next removed as perfectly as possible by perfusion with the Ringer solution through aorta.

A weighed mass of the tissue was then ground with 0.7% saline solution and transferred into a vessel containing a measured quantity of watery glucosamine chlorhydrate solution, added to a volume of 0.1 n NaOH solution sufficient to neutralize the HCl of glucosamine chlorhydrate and finally increased to so much volume with 0.7% saline solution that the total NaCl added corresponded to 0.85%, and the amount of glucosamine chlorhydrate to 400 mg% of the final mixture.

The mixture was then incubated at 37°C, after being added

to with two drops of toluene; and portions of it were drawn at the intervals given in the table. Estimation of glucosamine was made with these portions, using 1 cc., by following the procedures of tissue analysis noted in a previous publication by Kawabe (1934). Blank experiments were carried out by boiling the tissue suspension in advance of mixing with the glucosamine chlorhydrate solution.

The blood was applied to the experiment after being defibrinated. The estimation was conducted, using 1 cc. of the suspension, by the method of blood analysis.

#### EXPERIMENTAL.

In all experiments, grown up animals were employed.

##### a) *Experiment on normal animals.*

TABLE I.

Exp: on tissues of normal rabbits, dogs and cats.

Tissue applied for incubation: 2 gm. (blood 10 cc.)

Glucosamine chlorhydrate applied for digestion: 48 mgm.

Initial total volume of the mixture: 12 cc.

Animal	Tissue		Glucosamine content in terms of the chlorhydrate in 0.5 cc of the digestion mixture (mgm.)					
			0	1	3	5	7	
			hours (incubation)					
Rabbit no. 1 ♂ 2150 gm.	Lung	{	remaining unchanged	1.96	1.58	1.48	1.46	1.34
			decomposed		0.38	0.48	0.50	0.62
	Pancreas	{	remaining unchanged	1.94	1.90	1.78	1.60	1.56
			decomposed		0.04	0.16	0.34	0.38
Rabbit no. 2 ♂ 1985 g	Lung	{	remaining unchanged	1.98	1.72	1.60	1.44	1.18
			decomposed		0.26	0.38	0.54	0.80
	Pancreas	{	remaining unchanged	1.96	1.74	1.70	1.42	1.36
			decomposed		0.22	0.26	0.54	0.60

Rabbit no. 3 ♂ 2500 gm.	Liver	{ remaining unchanged	2.02	1.78	1.63	1.47	1.39
		{ decomposed		0.24	0.49	0.55	0.63
	Kidney	{ remaining unchanged	1.97	1.79	1.69	1.68	1.58
		{ decomposed		0.18	0.28	0.29	0.39
	Mucosa <sup>11</sup> of small intestine	{ remaining unchanged	2.0	1.70	1.69	1.46	1.40
		{ decomposed		0.30	0.31	0.54	0.60
	Blood	{ remaining unchanged	1.94	1.94	1.89	1.89	1.80
		{ decomposed		0	0.05	0.05	0.14
	Mucosa <sup>11</sup> of stomach	{ remaining unchanged	1.98	1.98	1.91	1.90	1.90
		{ decomposed		0	0.07	0.08	0.08
Rabbit no. 4 ♀ 2750 gm.	Liver	{ remaining unchanged	2.02	2.0	1.66	1.60	1.60
		{ decomposed		0.02	0.36	0.42	0.42
	Kidney	{ remaining unchanged	2.0	1.96	1.61	1.56	1.56
		{ decomposed		0.04	0.39	0.44	0.44
	Mucosa of small intestine	{ remaining unchanged	2.0	1.98	1.88	1.82	1.68
		{ decomposed		0.02	0.12	0.18	0.32
	Blood	{ remaining unchanged	2.0	2.0	2.0	1.74	1.74
		{ decomposed		0	0	0.26	0.26
	Mucosa of stomach	{ remaining unchanged	2.0	1.98	1.98	1.90	1.80
		{ decomposed		0.02	0.02	0.10	0.20
Rabbit no. 5 ♂ 2380 gm.	Liver	{ remaining unchanged	2.0	1.80	1.54	1.48	1.48
		{ decomposed		0.20	0.46	0.52	0.52
	Kidney	{ remaining unchanged	2.0	1.86	1.56	1.56	1.48
		{ decomposed		0.14	0.44	0.44	0.52
	Mucosa of small intestine	{ remaining unchanged	2.0	1.96	1.84	1.68	1.48
		{ decomposed		0.04	0.16	0.32	0.52
	Blood	{ remaining unchanged	2.02	2.0	2.0	1.96	1.80
		{ decomposed		0.02	0.02	0.06	0.22



Rabbit No. 5	Mucosa of stomach	remaining unchanged	2.0	1.96	1.96	1.90	1.84
		decomposed		0.04	0.04	0.10	0.16
Rabbit no. 6 ♀ 2500 gm.	Liver	remaining unchanged	2.0	1.81	1.54	1.36	1.30
		decomposed		0.19	0.46	0.64	0.70
	Kidney	remaining unchanged	2.0	1.96	1.94	1.56	1.50
		decomposed		0.04	0.06	0.44	0.50
	Mucosa of small intestine	remaining unchanged	2.02	1.92	1.76	1.70	1.58
		decomposed		0.10	0.26	0.32	0.44
	Blood	remaining unchanged	2.0	2.0	1.94	1.86	1.80
		decomposed		0	0.06	0.14	0.20
	Mucosa of stomach	remaining unchanged	2.0	2.0	1.96	1.84	1.84
		decomposed		0	0.04	0.16	0.16
Dog no. 1 ♀ 8700 gm.	Liver	remaining unchanged	2.0	1.74	1.62	1.56	1.44
		decomposed		0.26	0.38	0.46	0.56
	Kidney	remaining unchanged	2.0	2.0	1.90	1.84	1.52
		decomposed		0	0.10	0.16	0.48
	Mucosa of small intestine	remaining unchanged	2.02	1.86	1.76	1.58	1.40
		decomposed		0.16	0.26	0.44	0.62
	Blood	remaining unchanged	2.02	2.0	1.92	1.76	1.76
		decomposed		0.02	0.10	0.26	0.26
	Mucosa of stomach	remaining unchanged	2.0	1.96	1.96	1.80	1.80
		decomposed		0.04	0.04	0.20	0.20
Dog no. 2 ♀ 6800 gm.	Liver	remaining unchanged	2.0	1.74	1.74	1.56	1.40
		decomposed		0.26	0.26	0.44	0.60
	Kidney	remaining unchanged	2.0	1.96	1.94	1.78	1.54
		decomposed		0.04	0.06	0.22	0.46
	Mucosa of small intestine	remaining unchanged	2.0	1.94	1.78	1.56	1.50
		decomposed		1.06	0.22	0.44	0.50

Dog. no. 2	Blood	{ remaining unchanged	2.0	1.96	1.94	1.82	1.72
		{ decomposed		0.04	0.06	0.18	0.28
	Mucosa of stomach	{ remaining unchanged	2.0	2.0	1.96	1.94	1.90
		{ decomposed		0	0.04	0.06	0.10
Dog no. 3 ♀ 6500 gm.	Liver	{ remaining unchanged	1.97	1.72	1.64	1.52	1.42
		{ decomposed		0.25	0.33	0.45	0.57
	Kidney	{ remaining unchanged	1.98	1.86	1.78	1.56	1.46
		{ decomposed		0.12	0.20	0.42	0.52
	Mucosa of small intestine	{ remaining unchanged	1.97	1.90	1.82	1.50	1.42
		{ decomposed		0.07	0.15	0.47	0.55
	Blood	{ remaining unchanged	2.0	2.0	1.86	1.86	1.82
		{ decomposed		0	0.14	0.14	0.18
	Mucosa of stomach	{ remaining unchanged	1.97	1.92	1.82	1.80	1.76
		{ decomposed		0.05	0.15	0.17	0.21
Cat no. 1 ♀ 3100 gm.	Liver	{ remaining unchanged	2.0	1.68	1.60	1.46	1.44
		{ decomposed		0.32	0.40	0.54	0.56
	Kidney	{ remaining unchanged	1.96	1.76	1.64	1.58	1.50
		{ decomposed		0.20	0.32	0.38	0.46
	Mucosa of small intestine	{ remaining unchanged	2.0	1.64	1.58	1.34	1.32
		{ decomposed		0.36	0.42	0.66	0.68
	Blood	{ remaining unchanged	2.0	2.0	1.94	1.84	1.74
		{ decomposed		0	0.06	0.16	0.26
	Mucosa of stomach	{ remaining unchanged	1.98	1.98	1.88	1.80	1.76
		{ decomposed		0	0.10	0.18	0.22
Cat no. 2 ♂ 2800 gm.	Liver	{ remaining unchanged	2.0	1.64	1.54	1.52	1.36
		{ decomposed		0.36	0.46	0.48	0.64
	Kidney	{ remaining unchanged	1.98	1.84	1.78	1.46	1.42
		{ decomposed		0.14	0.20	0.52	0.56

Cat. no. 2 ♀ 2800 gm.	Mucosa of small intestine	remaining unchanged	2.0	1.74	1.68	1.54	1.38
		decomposed		0.26	0.32	0.46	0.62
	Blood	remaining unchanged	2.0	1.98	1.92	1.90	1.74
		decomposed		0.02	0.08	0.10	0.26
	Mucosa of stomach	remaining unchanged	1.94	1.90	1.84	1.84	1.80
		decomposed		0.04	0.10	0.10	0.14

1) The mucosa was scraped from the whole stomach or from the total small intestine including duodenum with a scalpel after being washed exhaustively under the tap water, and 0.3 gm. was taken from it for experiment.

TABLE II.

Experiment on tissues of a normal guinea-pig.

Tissue applied for incubation

in case of liver 2 gm.

„ kidney 1.5 gm.

„ blood 3 cc.

Glucosamine chlorhydrate used for digestion

in case of liver 48 mgm.

„ kidney 36 mgm.

„ blood 16 mgm.

Initial total volume of the digestion mixture

in case of liver 12 cc.

„ kidney 9 cc.

„ blood 4 cc.

Animal	Tissue		Glucosamine content in terms of the chlorhydrate in 0.5 cc of the digestion mixture (mgm.)	
			0	300 min. (incubation)
Guinea pig no. 1 (570 gm.)	Liver	remaining unchanged	2.0	2.0
		decomposed		0
	Kidney	remaining unchanged	1.98	1.97
		decomposed		0.01
	Blood	remaining unchanged	2.0	2.0
		decomposed		0

Judging from the extent of decomposition, the enzyme is, in rabbits, relatively rich in lung and liver, kidney, the mucous membrane of small intestine, and pancreas, poor in blood and musosa of stomach. Almost similar results were obtained with dogs and cats, but on the contrary the guinea pig is devoid of it or contains but a minute quantity, if at all, as table II proves.

In other words, the distribution of the enzyme varies according to the species, and does not depend on whether the animal belongs to herbivora or to carnivora.

b) *The effect of glucosamine injection on the enzyme content.*

Furthermore, the writer injected subcutaneously glucosamine chlorhydrate to two rabbits and two guinea-pigs successively for days, with the expectation that the enzyme might be produced or increased by the so-called "training" of the body to this compound. The animals were injected subcutaneously once a day for five consecutive days with the substance, then killed, and the enzyme content was estimated as described.

Tables III and IV seem to show that in rabbits the blood, but not other tissues, becomes richer in the enzyme to some extent, and that in guinea-pigs, all of liver, kidney and blood produce a small amount of it. But a decisive conclusion can not be given at once, as the increase of decomposition is not sufficient to justify affirming the effect of injection.

Sincere thanks are due to Professor K. Kodama for criticisms and advice; to Dr. M. Mita, Professor of Pediatrics, for encouragement; and to Assistant Professor H. Masamune for kind direction throughout this work.



TABLE III.

Exp. on tissues of rabbits injected with glucosamine.

Dosis of glucosamine chlorhydrate (injected at one time): 0.2 gm.  
per kgm. bodyweight.

The prescription of the incubation mixture is the same as in table I.

Animal	Tissue		Glucosamine content in terms of the chlorhydrate in 0.5 cc of the digestion mixture (mgm.).				
			0	60	80	300	420
			min. (incubation)				
Rabbit no. 7 ♂ 2300 gm.	Liver	remaining unchanged	2.02	1.98	1.35	1.33	1.31
		decomposed		0.04	0.65	0.65	0.71
	Kidney	remaining unchanged	2.0	2.0	1.75	1.74	1.74
		decomposed		0	0.25	0.26	0.26
	Mucosa of small intestine	remaining unchanged	2.0	1.80	1.70	1.61	1.57
		decomposed		0.20	0.30	0.39	0.43
	Blood	remaining unchanged	2.02	2.02	1.94	1.76	1.59
		decomposed		0	0.08	0.26	0.43
	Mucosa of stomach	remaining unchanged	2.02	2.02	2.02	1.98	1.98
		decomposed		0	0	0.04	0.04
Rabbit no. 8 ♂ 2800 gm.	Liver	remaining unchanged	2.04	2.02	1.60	1.53	1.50
		decomposed		0.02	0.44	0.51	0.54
	Kidney	remaining unchanged	2.02	1.78	1.70	1.63	1.56
		decomposed		0.24	0.32	0.39	0.46
	Mucosa of small intestine	remaining unchanged	2.02	1.85	1.78	1.72	1.54
		decomposed		0.24	0.32	0.39	0.46
	Blood	remaining unchanged	2.04	1.74	1.72	1.44	1.44
		decomposed		0.32	0.60	0.60	0.60
	Mucosa of stomach	remaining unchanged	2.0	2.0	1.98	1.98	1.62
		decomposed		0	0.02	0.02	0.18

TABLE IV.

Exp. on tissues of guinea-pigs injected with glucosamine.

The prescription of the incubation mixture is the same as in table II.

Guinea-pig no. 2. Body weight 265 gm.

Dosis of glucosamine chlorhydrate (injected at one time):

1 gm. per kgm. body weight.

Tissue		Glucosamine content in terms of the chlorhydrate in 0.5 cc. of the digestion mixture (mgm.)	
		0	300 min. (incubation)
Liver	remaining unchanged	1.98	1.74
	decomposed		0.24
Kidney	remaining unchanged	2.0	1.8
	decomposed		0.2
Blood	remaining unchanged	2.1	1.9
	decomposed		0.2

Guinea-pig no. 3. Body weight 557 gm.

Dosis of glucosamine chlorhydrate (injected at one time):

0.5 gm. per kgm. body weight.

Kidney	remaining unchanged	1.92	1.72
	decomposed		0.2
Blood	remaining unchanged	2.0	2.0
	decomposed		0
Liver	remaining unchanged	2.01	2.0
	decomposed		0.01

# REFERENCE.

Kawabe, K. (1934): J. of Biochem., 19, 319.



## BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

(Directed by Assistant Professor H. Masamune).

### VIII. The Distribution of Glucosamine Among Tissues when it is Administered into the Animal Body Subcutaneously or Perenterally, and its Renal Threshold.

By

KINJI KAWABE.

(From the Medico-chemical Institute, Kyushu Imperial University, Fukuoka.  
Director: Professor K. Kodama.)

(Received for publication, April 23, 1934)

Although glucosamine is disintegrated in the animal body as is already well established, not only the extent of absorption from the alimentary tract but also the tolerance of the body appears not so large.

Fabian (1899) detected the aminosugar in the alimentary tract of normal rabbits even 12 hours after its ingestion in the form of glucosamine chlorhydrate with sodium carbonate. It appeared partially in urine when given per os in dosis of 15–20 gm. but not in smaller dosis (3 gm.) In case of subcut. injection (2–3 gm), a large part passed through the kidney.

The result obtained by Offer and Fränkel (1899) was that when 10 to 20 gm. of glucosaminchlorhydrate were given p.o. to normal dogs, about 20% portion appeared in urine within the first seven hours, and some of the ingested was also recovered in the diarrheic feces. When 1 gm. of glucosamine chlorhydrate was injected subcutaneously 26% portion, in averages, was found in urine per hour. A similar experiment on the human body showed that excretion of glucosamine into urine was begun the second hour after its ingestion and continued for a long period.

In Bial's experiment (1905), where 2 gm. of glucosamine was injected subcutaneously to rabbits, which had been made free from



glycogen by strychnine intoxication, 65.4–72.5% portion appeared in urine unchanged.

All the works above enumerated show that the degree of assimilation of aminosugar in animal body is very low. On the contrary, Förschbach (1906) observed that dogs assimilated a large quantity (20 gm.) of a glucosamine derivative on feeding.

Meyer (1907) found that in two cases where the normal rabbit was injected with 3 gm. of acetylglucosamine (subcutaneous application, and the urine of the following 24 hours was collected) the urine showed the *p*-dimethylaminobenzaldehyde reaction, reduction and optical rotation, which corresponds to 1.27 and 1.22 gm. of the compound respectively. But when it was given per os (2 gm of acetylglucosamine to a normal rabbit, 7 and 8 gm to phlorhizin diabetes rabbits), no reducing substance was found either in urine or in feces of the normal rabbit, and in the intestinal content of phlorrhizinized rabbits.

Concerning the maximal assimilation, Stolte (1908) found that 0.1 gm. of glucosamine could be assimilated completely on intravenous injection in rabbits of moderate bodyweight but even the small dosis of 0.15 gm. caused the dextrorotation of urine.

But he found no glucosamine certainly eliminated in urine when it was given per os even in dosis of 3 gm. per day for six successive days.

Masai claimed that the rabbits (experimented on normal and fasting rabbits) tolerate about 4 gm. of the chlorhydrate per kilogram of bodyweight in perenteral transference.

With respect to the distribution among tissues of the aminosugar administered, no attempt has been as yet tried.

## EXPERIMENTAL.

### 1. *Analysis of blood and urine.*

Normal grown up rabbits which had been fed on bean curd refuse were used for the experiment, and on the day of experiment, the animal was not given any food or water. Glucosamine chlorhydrate was transferred in dosis of 2 gm. per kgm body weight

either per os or subcutaneously and in the former case, wrapped in a thin wafer and in the latter, after being dissolved in about 6 cc. water and neutralized with 2 n NaOH solution. (Diarrhea was never induced by ingestion of the substance.) The urinary bladder was emptied by catheterization just before transference and then urine and blood (from the ear vein) was collected at intervals. For each analysis, 0.25 cc. of urine and 2 cc. of blood were taken. The analysis was made by colorimetry (Kawabe 1934, 1) (table I a and b).

TABLE I.

a) Experiment in which glucosamine chlorhydrate was transferred p.o.

Rabbit no. 1 ♂. Body weight 1550 gm. (July 5)

Time elapsed after the substance was transferred hours	Blood glucosa- mine in terms of the chlorhydrate mgm. %	Urine			
		Reaction to litmus	Volume secreted cc.	Glucosamine content in terms of the chlorhydrate	
				mgm. %	mgm.
3	—	acid	5.5	336	18.48
5	—	"	3.6	524	18.86
6	—	"	2.9	568	16.42
7	—	"	3.2	384	12.28
8	—	"	2.9	340	9.86
10	—	"	6.0	340	20.4
24	—	"	46.0	+	

Rabbit no. 2 ♂, body weight 2156 gm. (July 13)

1	—	neutral	3.0	++	
2	—	acid	2.2	340	7.48
3	—	"	3.0	524	15.72
4	—	"	4.8	712	31.17
5	—	"	2.0	800	16.0
6	—	"	2.8	628	17.58
7	—	"	2.8	532	14.89
8	—	"	6.0	520	31.2
10	—	"	47.2	++	

Rabbit no. 3 ♂ body weight 1960 gm. (July 24)

1	—	neutral	3.6	++	
2	—	"	1.5	328	4.97
3	—	"	3.2	454	14.46
4	—	"	2.8	524	14.62
5	—	acid	2.7	600	16.2
6	—	"	2.8	680	19.04
7	—	"	2.7	588	15.87
8	—	"	3.0	484	14.52
10	—	"	5.9	400	23.6
24	—	"	35.0	++	

b) Experiments in which glucosamine was transferred subcutaneously.

Rabbit no. 4 ♂ 1950 gm. (July 17)

Time elapsed after the substance was transferred hour	Blood glucosa- mine in terms of the chlorhydrate mgm. %	Urine			
		Reaction to litmus	Volume secreted cc.	Glucosamine content in terms of the chlorhydrate	
				mgm. %	mgm.
1	53.5	neutral	4.7	748	35.15
2	60.0	"	5.1	800	40.8
3	59.0	"	2.6	1500	39.0
5	40.5	"	6.5	1332	85.58
6	++	"	1.3	1132	14.71
7	++	"	2.5	1052	27.3
8	+	"	2.0	944	18.88
10	±	"	2.4	920	22.08
24	—	"	40.0	++	

Rabbit no. 5 ♂ 1900 gm. (July 20)

1	55.0	neutral	4.9	832	40.76
2	57.5	"	3.4	1080	36.72
3	60.0	"	2.5	1024	25.60
4	41.5	"	1.5	1160	17.40
5	45.5	"	3.0	1032	30.96
6	++	"	1.5	908	13.62
7	++	"	2.7	272	23.54
8	±	"	2.1	800	16.8
10	±	"	2.0	800	16.0
24	—	"	50.0	++	

When glucosamine chlorhydrate was administered per os the reaction of urine shifted to the acid side, chiefly owing to HCl which constitutes the applied substance. The aminosugar was detected already in the urine of the first one hour and was secreted most extensively between the 5th and the 7th hour both in absolute amount and in percentage, whereas its content of blood was almost nil. Accordingly, the renal threshold of this compound is very low and even the trace of it passes through the kidney when accumulated.

Next the tolerance of normal rabbits against glucosamine chlorhydrate is less than 2 gm. per kilogram of body weight when administered in this way; namely, much less than Masai described.

When the substance was applied subcutaneously, the urine reaction which was alkaline before injection did not go over beyond the neutral, because the substance was neutralized previously. The aminosugar content of blood was high in the first few hours, as expected, and arrived at the maximum at the second or third hour and the elimination was, in accord with the blood figure, most remarkable in the first five hours.

## 2. *Tissue analysis.*

From the above results, the writer chose the fifth and the third hour respectively for observing the distribution of the aminosugar in organs, after administration of the substance parenterally and subcutaneously. At these moments, when the aminosugar is most abundant in blood, the rabbits were killed by bleeding from carotis with precautions for removing as much blood as possible and organs were excised, weighed quickly, and kept in ice for a short period until the analysis was begun. 0.3 g. of the tissue was taken for analysis.

Table II a and b indicate the results in one case of parenteral application (rabbit no. 8), the animal was killed at the third hour for comparison with the fifth hour. But the amount of glucosamine in tissues was not sufficient for quantitative analysis. The aminosugar was generally caught to a relatively large extent by liver and kidney, no matter how it was transferred. This fact coincides



TABLE II.

a) Experiments in which glucosamine chlorhydrate was given p.o.  
(2 gm per kgm body weight)

Rabbits no. 6 ♂ 1985 gm. (July 31)

The animal was killed at the 5th hour after transference of the substance.

Tissue, blood and urine	Volume or weight (cc. gm.)	Glucosamine in terms of its chlorhydrate	
		mgm. %	mgm.
Urine	22.0 cc. (collected for 5 hours, neutral)	656	133.32
Blood (at the 5th hour)		—	
Liver	40.2	+	
Kidney	11.9	+	
Lung	5.7	—	
Pancreas	2.4	—	
Small intestine mucosa <sup>1)</sup>	16.7 <sup>2)</sup>	+	
Stomach mucosa <sup>1)</sup>	49.0 <sup>2)</sup>	256	125.7

Rabbits no. 7 ♂ 2000 g (August 2)

The animal was killed at the 5th hour after transference of the substance.

Urine	16.0 (collected for 5 hours, acid)	616	98.59
Blood (at the 5th hour)		—	
Liver	37.7	+	
Kidney	11.7	+	
Lung	5.8	—	
Pancreas	1.6	±	
Stomach mucosa <sup>1)</sup>	16.0 <sup>2)</sup>	++	
Small intestine mucosa <sup>1)</sup>	46.7 <sup>2)</sup>	343	160.33

Rabbits no. 8 ♂ 1500 gm. (August 10)

The animal was killed at the 3rd hour after transference of the substance.

Urine	6.1 cc (collected for 3rd hour, neutral)	348	21.22
Liver	26.5	+	
Kidney	7.8	±	
Lung	5.4	—	
Pancreas	1.3	—	
Stomach mucosa <sup>1)</sup>	18.5 <sup>2)</sup>	—	
Small intestine mucosa <sup>1)</sup>	35.6 <sup>2)</sup>	±	

- b) Experiments in which glucosamine was injected subcutaneously.  
(2 gm. per kgm. bodyweight in terms of its chlorhydrate.)

Rabbit no. 9 ♂ (July 28)

The animal was killed at the 3rd hour after transference of the substance.

Tissue, blood and urine	Volume or weight (cc. gm.)	Glucosamine in terms of its chlorhydrate	
		mgm. %	mgm.
Urine	13.2 cc. (collected for 3 hours, neutral)	1040	137.28
Blood (collected at the 3rd hour)		89	
Liver	40.5	300	121.5
Kidney	10.0	406.6	40.66
Lung	7.4	+	
Pancreas	3.9	++	
Stomach mucosa <sup>1)</sup>	17.0 <sup>2)</sup>	233.3	39.6
Small intestine mucosa <sup>1)</sup>	52.0 <sup>2)</sup>	++	

Rabbit no. 10 ♂ (August 7)

The animal was killed at the 3rd hour after transference of the substance.

Urine	23.0 cc. (collected for 3 hours, neutral)	1240	285.2
Blood collected at the 3rd hour)		92.0	
Liver	39.0	293	114.4
Kidney	9.5	530	50.35
Lung	7.2	++	
Pancreas	1.8	++	
Stomach mucosa <sup>1)</sup>	21.7 <sup>2)</sup>	210	45.57
Small intestine mucosa <sup>1)</sup>	35.0 <sup>2)</sup>	++	
Muscle (m. rect. fem.)		—	

- 1) The inside of stomach and small intestine were well washed under the running water and the mucosa was scraped from it with a scalpel.
- 2) Mucosa of the whole stomach and of the total small intestine including duodenum were weighed.

with the distribution of the aminosugar disintegrating enzyme (Kawabe 1934, 2) and suggests that these organs are main places of utilizing or detoxicating the compound in discussion. Kidney plays naturally another rôle, in addition; namely, secretion. Glucosamine seems to be retained here also for this purpose.

That the stomach accumulates a relatively large amount, especially when injected subcutaneously, is difficult to interpret. It might contribute for synthesis of mucoitinsulfuric acid or be secreted from here, although the latter supposition is not so probable. When given per os, it is not improbable that the aminosugar is absorbed here in some degree, because the slight absorption of the ordinary sugar is proved already.

A comparatively large amount of it in the intestinal mucosa might have been caught when administered per os (table II a), but the substance can be taken up also from blood, judging from the results in table II b.

The amount in the mucous membrane of intestine in subcutaneous application was equal to that of pancreas and lung. The enzyme contents of these organs were found also nearly equal to one another. (Kawabe 1934, 2).

In muscle no aminosugar was detected in one case of perenteral administration.

#### SUMMARY.

1. When glucosamine chlorhydrate was transferred to a rabbit per os in dosis of 2 gm. per kgm body weight, it is scarcely detected in blood. In urine it appears ad maximum between the 5th and the 7th hour after ingestion. The renal threshold of this compound is very low.

At the fifth hour, it is piled up the most in the mucosa of small intestine and next to it in liver, kidney, and the mucosa of stomach. The amount in pancreas was almost negligible.

The capacity of the body to tolerate it is less than 2 gm. for kgm body weight.

2. When ingested subcutaneously, it appeared quickly in urine and the content of blood was highest at between the second

and the third hour. At the third hour, the distribution of the substance among tissues was in the following order, decreasing from left to right.

Liver, kidney, stomach mucosa.

Besides these organs, the mucous membrane of the small intestine, pancreas and lung were found to have caught it distinctly.

Sincere thanks are due to Professor K. Kodama for criticisms and advice; to Dr. M. Mita, Professor of Pediatrics, for encouragement; and to Assistant Professor H. Masamune for kind direction throughout this investigation.

#### REFERENCE.

- Bial (1905): Berl. klin. Wochenschrift. Festnummer f. Ewald, 44.  
 Fabian, E. (1899): Hoppe Seyler's Zeitschr. f. Physiologische Chemie, 39, 423.  
 Forschbach, T. (1906): Beiträge zur chem. Phys. u. Path., 8, 313.  
 Kawabe, K. (1934, 1): J. of Biochemistry, 19, 319.  
 Kawabe, K. (1934, 2): J. of Biochemistry, 20, 237.  
 Meyer, K. (1906): Beiträge zur chem. Phys. u. Path., 9, 134.  
 Offer, T. R. u. Fränkel, S. (1899): Centr. f. Physiol., 13, 489.  
 Stolte, K. (1908): Beiträge zur chem. Phys. u. Path., 11, 19.





## DIE CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DES DARMES.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji.)

### I. Mitteilung.

#### Chemische Untersuchung des Darmsaftes.

VON

GOICHI IKEDA.

(Aus der Inneren-Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 23. April 1934)

Seit Thiry (1864) (1) eine Isolierungsmethode eines Darmstückes in Vorschlag brachte, sind experimentelle Untersuchungen mit reinem Darmsafte hauptsächlich über seine fermentativen Wirkungen erschienen, wogegen Untersuchungen über die Zusammensetzung seiner chemischen Bestandteile relativ vernachlässigt wurden. Bis in die jüngste Zeit war die Kenntnis über die Bestandteile des Magensaftes wie des Darmsaftes sehr mangelhaft. In letzter Zeit (1929–1931) sind verschiedene bestimmte organische Bestandteile regelmässig im tierischen sowie im menschlichen Magensaft als Stoffwechselprodukte in der Magenwandung von meinen Kollegen gefunden worden. Dieser Befund gab uns nicht wenig Anregung zu weiteren Untersuchungen über den Chemismus in der Magenschleimhaut, welche jetzt mit Erfolg im Gang sind. Auf Veranlassung von Prof. Tsudji stellte ich eine Untersuchung mit Darmsaft an, um zuerst seine Bestandteile festzustellen, wodurch der Chemismus in der Darmschleimhaut allmählich aufgeklärt werden dürfte.

Was die Bestandteile des Darmsaftes betrifft, fand Thiry (1864) zuerst im Hundedarmsafte die feste Substanz auf 2,111–2,781 g% und die Ashensubstanz auf 0,76–0,97 g% und Moreau (1868) (3) im filtrierten Darmsafte doppeltkohlensaure Salze in einer Menge, welche 0,2 g% Natron auf 100 Flüssigkeit entspricht, und organische Substanz 0,35–0,45 g, anorganische Substanz 0,9–0,95 g auf 100 Flüssigkeit, und Chlor auf 32–45 g% in der Asche.

Demant (1897) (4) beobachtete, dass Kohlensäure bei Zusatz von Essigsäure sich lebhaft im Darmsafte entwickelte, welcher aus der isolierten Darmfistel des Kranken ausfloss. Etwas genauer untersuchten Gumilewski (1886) und Mendel (1896) das Problem mit reinem Hundedarmsafte. Die Resultate werden der Bequemlichkeit halber tabellarisch wie folgt zusammengestellt (tit. nach Oppenheimer H. d. Biochem. 567, IV, 1925.):

	Nach Gumilewski Hund		Nach Mendel Hund (durchschnittlich)
	I	II	
Trockensubstanz	1,36 %	1,68 %	1,45 %
Wasser	98,64	98,32	98,55
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,44	0,54	0,423
NaCl	0,50	0,48	0,507
Eiweiss	0,47	0,64	0,136

Endlich konnten Brugsch und Schittenhelm eine nenenswerte Menge von Purinkörper in 50 g. Darmsaft nicht nachweisen, woraus allerdings nicht entnommen werden kann, dass der Darmsaft Nuklein in irgend einer in Betracht kommender Weise enthält.

Wie man aus der obigen Schilderung versteht, sind die Kenntnisse über die Bestandteile des Darmsaftes so minimal, dass damit keine chemische Tätigkeit in der Darmwand begrifflich gefasst werden kann, wozu es vor allem unbedingt nötig wäre, nicht nur seine anorganischen Substanzen, sondern auch die organischen Bestandteile noch genauer zu untersuchen.

Da die physiologische Tätigkeit des Darmes je nach seinem Abschnitte nicht gleich ist, dürften der Chemismus in der Schleimhaut, bzw. die Bestandteile des Darmsaftes demgemäss verschieden sein. In dieser Arbeit führte ich Untersuchungen über die Bestandteile im oberen Abschnitte des Ileum aus.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Einem kräftigem Hunde wurde der Bauch geöffnet und im oberern Teil des Dünndarmes ein Darmstück ungefähr 30 cm. lang

isoliert, dessen oberes Ende vom unteren Ende des Zwölffingerdarmes 20 cm. entfernt war, und dem betreffenden Darmrohr eine Thiry-Vella Fistel angelegt. Erst nach 2 Wochen wurde der Hund zum Versuche vorgeführt. Im allgemeinen war die Saftsekretion im diesem Darmsabschnitte sowohl im nüchternen Zustand, als auch in der Verdauungszeit immer so gering, dass mit dem Saft chemisch zu arbeiten kaum möglich war.

Wenn aber 11%ige Pilocarpinchlorhydratlösung 1 cc. dem Hunde subcutan injiziert wurde, stieg die Secretion immer so prompt auf, dass man zur chemischen Untersuchung genügend reichlich Saft bekommen konnte. Der Saft erreichte nicht selten in einer Stunde bis zu 30 cc. Vorher wurde das isolierte Darmrohr mit lauwarmem Wasser gut gewaschen, bis die Waschlösung keine Trübung mehr zeigte, und dann die Pilocarpinlösung subcutan dargereicht. Dem sezernierten Darmsafte waren immer Schleimflocke beigemischt. Er wurde filtriert. Das Filtrat, welches zur Untersuchung diente, war eine Spur opalescent, reagierte auf Laemuspapier stark alkalisch.

### I. Die Aschenbestandteile.

Darmsaft wurde in der Menge von 200 cc. abgemessen, getrocknet und dann verascht. Die Asche wurde über Kalium, Natrium, Chlor, Magnesium, Calcium, Schwefel, Phosphorsäure und Kieselsäure quantitativ untersucht. Chlor wurde nach Volhard's Methode, Natrium und Kalium als Platinsalz, Calcium als Calciumoxalat, Phosphor nach Neumann's Methode bestimmt. Die Re-

TABELLE I.  
Asche in 100 cc. Darmsaft des Hundes.

Versuch-Nr.	Feste substanz. (g)	Organische substanz. (g)	Anorganische substanz. (g)	K (g)	Na (g)	CaO (g)	MgO (g)	Cl (g)	Gesamt-S (g)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (g)	Kieselsäure (g)
I	2,4205	1,4510	0,9695	0,0415	0,3325	0,0105	0,0012	0,4760	0,0025	0,0190	0,0034
II	2,2630	1,3161	0,9469	0,0580	0,3090	0,0112	0,0011	0,4610	0,0013	0,0215	0,0017
Durchschnitt.	2,3418	1,3836	0,9582	0,0498	0,3208	0,0109	0,0012	0,4685	0,0019	0,0203	0,0026



sultate sind nachstehend tabellarisch zusammengestellt.

Im Durchschnitte fand ich feste Substanz 2,3418 g: organische Substanz 1,3836 g und anorganische Substanz 0,9582 g auf 100 Flüssigkeit, was mit den Angaben von Thiry, Moreau, Gumilewski und Mendel fast übereinstimmt. Unter den einzelnen Aschenbestandteilen wurde der Wert von Natrium und Kalium sehr hoch gegen die anderen gefunden.

## II. Die Stickstoffhaltigen Bestandteile.

Ges.-N, Rest-N, Harnstoff, Ammoniak, Aminosäure, Kreatin u. Kreatinin.

Ges.-Stickstoff vom filtrierten Darmsafte wurde nach Kjeldahl bestimmt. Zur Bestimmung von Rest-N wurden die Darmsäfte mit Essigsäure enteiwisst, filtriert und das Filtrat nach

TABELLE II.

Hund I.

Versuchs-Nr.	Gesamt-N mg%	Rest-N mg%	Ammoniak-N		Harnstoff-N		Aminosäure-N	
			mg%	%gegen R-N	mg%	%gegen R-N	mg%	%gegen R-N
I	252,0	103,6	25,2	24,3	5,6	5,4	28,9	27,9
II	98,0	78,4	22,4	28,6	8,4	10,7	18,1	23,1
III	196,0	89,6	25,2	28,1	7,0	7,8	21,8	24,3
Durchschnitt.	182,0	90,0	24,3	27,0	7,0	8,0	22,9	25,1

TABELLE III.

Hund II.

Versuchs-Nr.	Gesamt-N mg%	Rest-N mg%	Ammoniak-N		Harnstoff-N		Aminosäure-N	
			mg%	%gegen R-N	mg%	%gegen R-N	mg%	%gegen R-N
I	341,6	123,2	22,4	18,2	14,0	11,4	15,6	12,7
II	156,8	109,2	16,8	15,4	16,8	15,4	20,4	18,7
III	316,4	81,2	25,2	31,0	5,6	6,9	20,9	25,7
IV	291,2	92,4	26,6	23,8	4,2	4,5	26,4	28,6
Durchschnitt.	276,5	101,5	22,7	23,4	10,2	9,6	20,9	21,4

TABELLE IV.

Hund III.

Versuchs-Nr.	Gesamt-N mg%	Rest-N mg%	Ammoniak-N		Harnstoff-N		Aminosäure-N	
			mg%	%gegen R-N	mg%	%gegen R-N	mg%	%gegen R-N
I	165,2	70,0	19,6	28,0	8,4	12,0	21,0	30,0
II	285,6	81,2	26,6	32,8	4,2	5,2	18,6	22,9
Durchschnitt.	225,4	75,6	23,1	30,4	6,3	8,6	19,8	26,5

TABELLE V.

Hund IV.

Versuchs-Nr.	Gesamt-N mg%	Rest-N mg%	Ammoniak-N		Harnstoff-N		Aminosäure-N	
			mg%	%gegen R-N	mg%	%gegen R-N	mg%	%gegen R-N
I	196,0	70,0	25,2	36,0	11,2	16,0	17,5	25,0
II	126,0	70,0	28,0	40,0	11,2	16,0	16,2	23,1
Durchschnitt.	161,0	70,0	26,6	38,0	11,2	16,0	16,9	24,1

Kjeldahl verbrannt. Harnstoff und Ammoniak wurden nach Van-Slyke-Cullen bestimmt. Aminosäure des Darmsaftes wurde nach Enteiweissung mit Essigsäure nach Van-Slyke's Methode bestimmt.

Im Durchschnitte fand ich Ges.-N 211,2 mg, R-N. 84,3 mg, Ammoniak-N 24,2 mg, Harnstoff-N 8,7 mg und Aminosäure-N 20,1 mg auf 100 Flüssigkeit. Nämlich wurde der Wert von Ammoniak-N und von der Aminosäure-N sehr hoch gefunden.

TABELLE VI.

Versuchs-Nr.	Gesamt-N mg%	Rest-N mg%	Ammoniak-N		Harnstoff-N		Aminosäure-N	
			mg%	%gegen R-N	mg%	%gegen R-N	mg%	%gegen R-N
I	182,0	90,0	24,3	27,0	7,0	8,0	22,9	25,1
II	276,5	101,5	22,7	23,4	10,2	9,6	20,9	21,4
III	225,4	75,6	23,1	30,4	6,3	8,6	19,8	26,5
IV	161,0	70,0	26,6	28,4	11,2	16,0	16,9	24,1
Durchschnitt.	211,2	84,3	24,2	29,7	8,7	10,6	20,1	24,3

Zur Bestimmung des Kreatins und Kreatinins wurde der filtrierte Darmsaft in der Menge von 501 cc. benützt. Die Flüssigkeit wurde mit Bleiessig enteiweissst, filtriert. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert. Nach Verjagung von  $H_2S$  wurde das Filtrat bis zu einem kleinen Volumen im Vacuum eingengt und in einen 25 cc. fassenden Messkolben aufgenommen und nach Jaffe colorimetrisch untersucht.

TABELLE VII.

Hund Nr.	Menge cc.	Kreatin mg%	Kreatinin mg%
I	50	1,44	1,23
II	50	1,80	0,91
Durchschnitt.		1,62	1,07

Wenn man die einzelnen Bestandteile der stickstoffhaltigen Substanzen im Darmsafte mit denjenigen Substanzen im Magensaft, welche von Inoue (1929), Hongo und Ide (1932) angegeben wurden, vergleicht, wird man leicht bemerken, dass die Werte im ersteren beträchtlich höher als die im letzteren sind.

TABELLE VIII.

Vergleichende Darstellung der Bestandteile des Magen- und Darmsaftes.

	Gesamt-N mg%	Rest-N mg%	Ammoniak-N mg%	Harnstoff-N mg%	Aminosäure-N mg%	Kreatin mg%	Kreatinin mg%
Magensaft	99,0		11,6	1,1	5,1	0,27	0,20
Darmsaft	211,2	84,3	24,2	8,7	20,1	1,62	1,07

## SCHLÜSSE.

Im Darmsafte, welcher aus dem oberen Teil des Dünndarmes mittels Pilocarpininjektion rein gewonnen wurde, fand ich als Aschenbestandteile: Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium, Chlor, Schwefel, Phosphorsäure und Kieselsäure, und als organische Substanzen: Harnstoff, Ammoniak, Aminosäure, Kreatin und

Kreatinin, in beiden Kategorien immer in bestimmter Menge.

Die einzelnen organischen Bestandteile sind im Darmsaft ihrer Menge nach doppelt bis 8 fach grösser als im Magensaft.

#### LITERATUR.

- Brugsch und Schittenhelm: Zur Frage der Herkunft der endogenen Harnsäure. *Zs. für exp. Path.* 4.  
 Damant (1879): *Arch. Path. (Virchow)*, 419.  
 Darmsaft aus Thiry-Vella-Fistel nach Gumilewski, *Pflüg. Arch.* 39.  
 Hongo und Ide (1932): *Nagasaki Igakkwai Zassi*, 854, 6, 10.  
 Ikebe (1931): *Nagasaki Igakkwai Zassi*, 1025, 5, 9.  
 Inoue (1929): *Nagasaki Igakkwai Zassi*, 984, 6, 7.  
 Matsuoka (1930): *Nagasaki Igakkwai Zassi*, 963, 5, 8.  
 Mendel (1896): *Pfl. Arch.*, 425, 63.  
 Moreau (1868): *Zbl. med. Wiss. Zit nach* 42.  
 Sumida und Hongo (1930): *Nagasaki Igakkwai Zassi*, 918, 5, 8.  
 Thiry (1864): *Ub. eine neue Methode, den Dünndarm zu isolieren. Wien. Akad.*, 4, 77–96.





## DIE CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DES DARMES.

### II. Mitteilung.

#### Durchblutungsversuche des Darmes mit Harnstoff.

VON

GOICHI IKEDA.

*(Aus der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan.*

*Vorstand: Prof. Dr. M. Tsudji.)*

(Eingegangen am 23. April 1934)

Das Ammoniak des Darmes wurde schon in der Darmsehleimhaut, im Darminhalt sowie im Pfortablute von vielen Autoren untersucht. Nach ihnen ist die Schleimhaut zur Verdauungszeit nach Fleischfütterung an Ammoniak bedeutend reicher als in der Ruhe oder im mit Brotmilch gefütterten Zustande und das Pfortablut enthält, besonders das der Äste, die aus den Verdauungsdrüsen stammen, zur Verdauungszeit 3–4 mal so viel Ammoniak als das arterielle Blut. Aus diesen Ergebnissen ist von manchen Autoren geschlossen worden, dass eine sich im Sinne der Ammoniakabspaltung abspielende Metamorphose in der Zellen der Verdauungsdrüsen zur Zeit ihrer Tätigkeit als Begleiterscheinung auftritt, und dass diese Ammoniakabspaltung vermutlich für den Desaminierungsprozess in der Darmwand spricht. Jedoch hält diese Auffassung genauerer Überlegung nicht Stand, weil, wenn das Ammoniak wirklich in der Darmwand gebildet wird, die Quelle des Ammoniaks nicht nur auf die Aminosäuren beschränkt ist, sondern das Ammoniak auch durch Zerfall anderer Substanzen entstehen kann. Ausserdem gibt es im Pfortablute Ammoniak, welches aus dem Darminhalt her stammt. Eigentlich ist uns nur wenig darüber bekannt, was für chemische Prozesse im allgemeinen in der Darmsehleimhaut, während der Verdauungszeit tatsächlich vor sich gehen. Beim Durchblutungsversuche des Magens beobachtete Sumida vor kurzem, dass dabei der Harnstoff einerseits in der Magenwand unterging, das Ammoniak andererseits neugebildet wurde. Wenn

dies der Fall ist, so mag auch der Harnstoff in der Darmwand in Ammoniak umgewandelt werden. Zum Studium der chemischen Prozesse in der Darmwand muss das Schicksal des Harnstoffes in der Darmwand und das Problem des Ammoniaks im Pforta in meinen Versuchsreihen, zuerst untersucht werden, weil die beiden Substanzen normale Bestandteile des Blutes sind. In unserer Klinik sind Durchblutungsversuche des Magens mit Erfolg unternommen worden, um den Chemismus in der Magenschleimhaut zu erforschen. Zum chemischen Studium der Darmwand wird die Durchblutung auch sehr geeignet sein, welche mit dem Darme jedoch bsher von niemand ausgeführt worden ist.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Experimente wurde der Nüchterndarm des Hundes gebraucht. Von Art. carotis wurde das Blut in der für die Durchblutung nötigen Menge gewonnen, sofort defibriert und koliert. Andererseits wurde Locke'sche Lösung dem Hunde intravenös injiziert, um das verlorene Blut zu ersetzen, und dann der Bauch geöffnet. Zur Durchblutung diente ein Stück von ungefähr 30 cm. langer Dünndarmschlinge, deren oberes Ende vom unteren Ende des Zwölffingerdarmes ungefähr 30 cm. entfernt war. Die beiden Enden des Darmabschnittes wurden fest unterbunden. Art. und Ven. mesent. sup. wurden zur Durchblutung gebraucht, indem die Gefässäste, welche mit der Blutversorgung des betroffenen Darmstücks keine Beziehung hatten, unterbunden wurden. Dann wurden Art.- und Ven. mesent. sup. isoliert, unterbunden und die Gefässstämme abgeschnitten. Darauf wurde die Darmschlinge vom Mesenterium befreit und aus der Bauchhöhle herausgenommen. Von Art. mesent. sup. wurde physiologische Kochsalzlösung ein und aus der Ven. mesent. sup. auströmt, um die Darmwand zu waschen, weil sonst die Durchblutung durch Bluteoagula gehindert wird. Die Durchblutung wurde nach Mizuki und Yamakawa ausgeführt. Harnstoff und Ammoniak wurden nach Van-Slyke und Cullen's Methode bestimmt.

*I. Kontrollversuche.*

Das defibrinierte Blut wurde ohne Zusatz von Harnstoff durch den Darm 3. Stunden durchgeströmt, ganz genau wie im Hauptversuche.

TABELLE I.

Versuchs-Nr.	Durchblutungs-dauer St.	Durchblutungs-blutmenge cc.	Harnstoff-N mg%	Ammoniak-N mg%
I	3,0	300	{ Vor 7,28 Nach 5,60	0,56 2,80
II	3,0	300	{ Vor 4,06 Nach 3,78	0,70 1,54
III	3,0	300	{ Vor 3,36 Nach 2,38	0,84 1,82
IV	3,0	300	{ Vor — Nach —	0,56 1,40
Durchschnitt.			{ Vor 4,90 Nach 3,92	0,67 1,89

Harnstoff-N, welcher im Vorblute 4,90 mg% im Durchschnitte sich belief, verminderte sich im Nachblute bis auf 3,92 mg%, und andererseits stieg der Ammoniak-N von 0,67 mg% bis 1,89 mg% auf. Nach dem Resultate macht es den Eindruck, dass der verlorene Harnstoff-N zum grossen Teil in der Ammoniak-N-Fraktion sich vorfand. Das Verhalten ist ganz ähnlich, wie beim Resultat des Versuches mit dem Magen, wo man in bezug auf das Ammoniak annehmen möchte, dass es wahrscheinlich in der Magenwand unter Verbrauch von Harnstoff gebildet wurde (Sumida). Um zu erfahren, ob der Harnstoff in der Darmwand wirklich in Ammoniak umgewandelt wird, führte ich Durchblutungsversuche des Darmes mit Harnstoff aus.

*II. Hauptversuche.*

In das durchströmende Blut wurde 250 mg Harnstoff zugesetzt. In allen Versuchen verminderte sich der Harnstoff beträchtlich,

TABELLE II.  
Belastungsversuche mit Harnstoff (ca. 250 mg).

Versuchs-Nr.	Durchblutungs-dauer St.	Durchblutungs-blutmenge cc.	Harnstoff-N mg%	Ammoniak-N mg%
I	2,0	300	{ Vor 35,84	0,28
			{ Nach 16,12	4,88
II	2,5	300	{ Vor 34,86	0,42
			{ Nach 14,84	3,08
III	3,0	300	{ Vor 40,88	0,56
			{ Nach 24,08	5,88
IV	3,0	300	{ Vor 35,00	0
			{ Nach 17,08	5,60
V	3,0	300	{ Vor 39,62	0,42
			{ Nach 22,68	4,20
Durchschnitt.			{ Vor 37,24	0,36
			{ Nach 18,96	4,73

nämlich stieg der Harnstoffwert, der im Vorblute 37,24 mg% im Durchschnitte betrug, nach der Durchblutung bis auf 18,96 mg% ab. Dabei stieg der Ammoniakwert von 0,36 mg% bis auf 4,73 mg% auf. Im Hauptversuche war das Verschiebungsbild des Harnstoff- und Ammoniakwertes im Blute nach der Durchblutung gegen den Kontrollversuch in ausgezeichneter Weise unterschieden. Wenn das Ammoniak wirklich unter Verbrauch von Harnstoff neugebildet wurde, möchte man annehmen, dass die Urease in der Darmwand existiert. Doch war das neugebildete Ammoniak in seiner Menge zu wenig, um den verschwundenen Harnstoff aufzufüllen.

Das Resultat, dass der Schwund des Harnstoffes nach der Durchblutung des Darmes beträchtlich gross war, stimmt mit dem Resultate beim Durchblutungsversuche des Magens mit Harnstoff ganz gut überein. Dabei konstatierte Sumida, dass ein Teil des Harnstoffes, welcher während der Durchblutung des Magens verloren geht, in der Schleimhaut sich ablagerte, aber ein grosser Teil desselben wahrscheinlich unter unbekanntem Chemismus in

der Magenwand zersetzt wurde. Ähnliche Resultate erwartend, untersuchte ich die Darmwand auf Harnstoff, um das Deficit desselben zu suchen. Die Methode entsprach genau der von Sumida inbezug auf den Magen angewandten.

### III. Kontrollversuch.

*Blut:* Der Harnstoff-N, welcher im Vorblute auf 4,76 mg% im Durchschnitte sich belief, stieg nach der Durchblutung bis auf 3,55 mg% ab, und andererseits stieg das Ammoniak von 0,47 mg bis 1,68 mg% auf. Der verlorengegangene Harnstoff-N d. h. 1,21 mg% wurde in vollen Umfang in der Ammoniak-N-Fraktion vorgefunden.

*Muskelschicht und Schleimhaut:* Nach der Durchblutung wurden der Harnstoff-N in den beiden Schichten jeder auf 0,09 mg% und der Ammoniak-N in der Muskelschicht auf 1,17 mg%, in der Schleimhaut auf 0,93 mg% vorgefunden.

### IV. Hauptversuch.

Der Harnstoff wurde dem Blute in der Menge von 300 mg zugesetzt und durchgeströmt.

*Blut:* Im Hauptversuche nach der Durchblutung stiegen der Harnstoff-N von 45,11 mg% bis auf 22,77 mg% ab und der Ammoniak-N von 0,75 mg% bis auf 4,20 mg% auf. In diesem Hauptversuche war die Menge des neugebildeten Ammoniak-N 3,45 mg% gegen 1,21 mg% in den Kontrollversuchen.

*Muskelschicht und Schleimhautschicht:* Nach der Durchblutung wurden der Harnstoff-N 2,05 mg% in der Muskelschicht und 3,08 mg% in der Schleimhaut und der Ammoniak-N 2,71 mg% in der Muskelschicht und 5,04 mg% in der Schleimhaut vorgefunden. Die Werte des Harnstoff- und Ammoniak-N in der Darmwand im Hauptversuche waren sehr gross gegen die Werte der Kontrollversuche.

In diesem Versuche verminderte sich der Harnstoff im Blute durch Durchblutung der Darmwand von 45,11 mg% bis auf 22,77 mg%. Also ging der Harnstoff in der Menge von 22,24 mg% im Prozentgehalt und zwar in der absoluten Menge von 66,72 mg



TABELLE III. Kontrollversuch.

Versuchs- Nr.	Durch- blutungs- blutmenge. cc.	Durch- blutungs- dauer. st.	Druck mm Hg.	Blut		Muskelschicht		Schleimhaut- schicht		Umgebungs- medium (Physiologische NaCl-lösung)	
				Harnstoff- N. mg%	Ammoniak- N. mg%	Harnstoff- N. mg%	Ammoniak- N. mg%	Harnstoff- N. mg%	Ammoniak- N. mg%	Harnstoff- N. mg%	Ammoniak- N. mg%
I	300	3,0	20	3,36	0,56	0	1,12	0	0,84	0,28	0,28
				2,24	1,68						
II	300	3,0	25	2,64	0,28	0	0,98	0	0,84	0,14	0
				2,24	1,40						
III	300	2,5	25	7,28	0,56	0,28	1,40	0,28	1,12	0,14	0,28
				6,16	1,96						
Durchschnitt				4,76	0,47	0,09	1,17	0,09	0,93	0,19	0,19
				3,55	1,68						

TABELLE IV.  
Belastungsversuche mit Harnstoff (ca. 300 mg).

Versuchs- Nr.	Durch- blutungs- blutmenge cc.	Durch- blutungs- dauer. st.	Druck mm Hg.	Blut		Muskelschicht.		Schleimhaut- schicht		Umgebungs- medium (Physiologische NaCl-Lösung)	
				Harnstoff- N. mg%	Ammoniak- N. mg%	Harnstoff- N. mg%	Ammoniak- N. mg%	Harnstoff- N. mg%	Ammoniak- N. mg%	Harnstoff- N. mg%	Ammoniak- N. mg%
I	300	3,0	30	44,04	0,56	0,56	3,36	2,52	5,32	0,84	0,84
				19,88	4,20	0,56					
II	300	3,0	25	46,20	0,84	3,08	1,96	3,08	4,76	0,84	0,84
				26,88	4,48						
III	300	3,5	25	45,08	0,84	2,52	2,80	3,64	5,04	0,56	1,12
				21,56	3,92						
Durchschnitt.			{ Vor Nach	45,11	0,75	2,05	2,71	3,08	5,04	0,70	0,98
				22,77	4,20						

verloren. Ein Teil des Harnstoffes wurde in der Darmwand vorgefunden. Er betrug insgesamt nur 5,13 mg. Also verschwand der Harnstoff in der absoluten Menge von 61,56 mg. Da der Harnstoff im Blute nach Parnas u. Heller im Laufe der Zeit nicht zersetzt wird, musste sich der Vorgang, durch welchen der Harnstoff verloren ging, in der Darmwand abspielen. Andererseits fand ich Ammoniak nach der Durchblutung des Darmes sehr vermehrt im Blute. Die Menge des neugebildeten Ammoniaks im Blute betrug 3,45 mg% und zwar in der absoluten Menge 10,35 mg. Ausserdem fand ich den Ammoniak-N 2,71 mg in der Muskelschicht und 5,04 mg in der Schleimhaut. Wenn es erlaubt ist, anzunehmen, dass das Ammoniak unter Verbrauch von Harnstoff entstanden war, so ist die Menge des Ammoniaks gegen den verschwundenen Harnstoff zu gering. Dieser Befund ist ganz ähnlich dem Befunde im Versuche mit dem Magen, wo der Harnstoff bei der Durchblutung in grosser Menge verloren ging und das Ammoniak in ganz kleiner Menge auftrat. Damals drückte Sumida aus, dass wenn die Urease wirklich in der Magenschleimhaut existiert, ihre Wirkung wenigstens nicht kräftig sein kann und der Harnstoff in einem grossen Teil in der Magenschleimhaut in andere Substanzen umgewandelt wurde, ohne Ammoniak zu bilden. Diese Anschauung gilt bei meinen Versuchen mit dem Darne vollkommen, wenn auch in betreff der Urease in der Darmwand noch keine Untersuchungen vorliegen. Wenn das Ammoniak, welches bei der Durchblutung des Darmes neugefunden wurde, wirklich unter Verbrauch von Harnstoff entstanden war, muss man der Darmwand eine ureatische Wirkung zuschreiben.

#### SCHLUSS.

1. Wenn der Dünndarm bloss mit Blut durchblutet wurde, ging der Harnstoff-N im Blute in einer bestimmten Menge verloren, wogegen der Stickstoff fast in der gleichen Menge in der Ammoniakfraktion vorgefunden wurde.

2. Wenn der Dünndarm mit Harnstoff durchblutet wurde, ging der Harnstoff-N in beträchtlich grosser Menge im Blute verloren, wogegen Ammoniak-N, welches im Blute und in der

Darmwand vorgefunden wurde, nur einem Bruchteil des verschwundenn Harnstoff-N entsprach.

LITERATUR.

- Holodynski, Salaskin u. Zaleski (1902): Ebenda, **36**, 246.  
Nencki, Pawlow u. Zaleski (1896): Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol., **37**, 26.  
Parnas (1926): Biochem. Zeitschr., **173**, 224.  
Parnas u. Heller (1924): Biochem. Zeitschr., **152**, 1.  
Salaskin (1898): Zeitschr. f. Physiol. Chem., **25**, 449.  
Sumida (1934): Diese Zeitschr., **19**, 449.





## DIE CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DES DARMES.

### III. Mitteilung.

#### Durchblutungsversuch des Darmes mit Glykokoll.

VON

GOICHI IKEDA.

(Aus der medizinischen Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki,  
Vorstand: Prof. Dr. M. Tsudji.)

(Eingegangen am 23. April 1934)

In der II. Mitteilung diskutierte ich daüber, dass das Ammoniak selbst, welches im Pfortablute reicher als im arteriellen Blute sich vorfindet, zum Beweis des Desaminierungsvorganges in der Darmwandung nicht ohne Weiteres verwertet werden kann, weil die Muttersubstanzen des Ammoniaks nicht nur auf Aminosäuren beschränkt sind, sondern es auch durch den Zerfall verschiedener N-haltigen Substanzen entstehen kann. Tatsächlich beobachtete ich vor kurzem, dass der Harnstoff bei der Durchblutung des Darmes zersetzt und das Ammoniak im Blute sehr vermehrt vorgefunden wurde. Also um zu erfahren, ob der Desaminierungsprozess in der Darmwand wirklich vor sich geht, muss nicht nur das Ammoniak Gegenstand der Untersuchung sein, sondern ein direkter Nachweis der Desaminierung mit Aminosäure selbst erbracht werden. Zu diesem Zwecke machte ich Durchblutungsversuche des Darmes zuerst mit Glykokoll. Bei der intravenösen Injektion von Glykokoll steigt der Ammoniakgehalt im Blute des Organismus (Salaskin, 1904), ebenfalls geht Ammoniak bei der Resorption von Glykokoll durch isolierte, überlebende Därme der Knochenfische in die Aussenflüssigkeit über (Cohnheim u. Makita, 1909). Durch viele Beobachtungen wurde es auch bestätigt, dass Glykokoll bei der Zersetzung in Gegenwart von Mikroorganismen flüssige Fettsäure liefert (Effront 1909, Nawiaski -908). Wenn das Glykokoll also wirklich in der Darmwand desaminiert wird, dürften dabei Ammoniak einerseits und Fettsäure andererseits entstehen.

## EXPERIMENTELLER TEIL.

Die Versuchsordnung war ganz die gleiche wie bei den Versuchen in der II. Mitteilung. Das Glykokoll wurde (ca. 1 g) dem durchströmenden Blute zugesetzt. Harnstoff und Ammoniak wurde nach Van-Slyke und Cullen und Aminosäure nach Van-Slyke bestimmt. Bezüglich der Fettsäure wurde das Blut (10 cc.) unter starker saurer Reaktion mit Phosphorsäure destilliert, bis der Dampf gegen Lakmuspapier keine saure Reaktion zeigte. Das Destillat, das immer sauer reagierte, wurde in einem Behälter mit einer bestimmten Menge von  $N/50$  NaOH-Lösung aufgenommen, und mit  $N/50$   $H_2SO_4$ -Lösung zurücktitriert.

## I

*Kontrollversuche.*

Das Blut wurde ohne Zusatz von Glykokoll durch den bestimmten oberen Abschnitt des Dünndarmes, wie im Versuche mit Harnstoff, durchgeströmt.

TABELLE I.  
Kontrollversuche.

Versuchs-Nr.	Harnstoff-N. mg%	Ammoniak-N. mg%	Amino-säure-N mg%	Dest.-säure (N/50 NaOH) cc.	Rest-N mg%	
I	Vor	7,28	0,56	12,56	2,2	—
	Nach	5,60	2,80	11,99	2,4	—
II	Vor	4,06	0,70	9,73	2,1	—
	Nach	3,78	1,54	8,53	1,7	—
III	Vor	3,36	0,84	7,60	—	33,6
	Nach	2,38	1,82	7,60	—	30,8
IV	Vor	—	0,56	9,43	1,2	61,8
	Nach	—	1,40	10,60	0,7	56,0
Durchschnitt.	Vor	4,90	0,67	9,83	1,8	47,7
	Nach	3,92	1,89	9,70	1,6	43,4

Ich bekam im normalen Blute immer destillierbare Säure in ganz geringer Menge, sodass die  $N/50$  Natronlaugelösung von

1,8 cc. zur neutralisation der Säure in 10 cc. des Blutes gebraucht wurde. Nach der Durchblutung des Darmes gab es keine nennenswerte Veränderung des Säurewertes. Der Aminosäure-N, der im Vorblute 9,83 mg% betrug, wurde im Nachblute auf 9,70 mg% vorgefunden. Dagegen verminderte sich der Harnstoff-N, der im Vorblute auf 4,90 mg% sich belief, im Nachblute bis auf 3,92 mg%, und andererseits stieg der Ammoniak-N von 0,67 mg% nach der Durchströmung bis auf 1,89 mg% auf. In diesen Experimenten wurde also beobachtet, dass die Verteilung des Harnstoffes und des Ammoniaks im Blute durch die Durchblutung des Darmes verändert wurde, indem der N von der Harnstoff-Fraktion nach der Ammoniak-Fraktion sich verschob, während der Wert der Fettsäure und der Aminosäure dadurch fast nicht beeinflusst wurde.

### Hauptversuche.

TABELLE II.  
Glykokoll (ca. 1 g)-Belastungsversuche.

Versuchs-Nr.	Harnstoff-N. mg%	Ammoniak-N. mg%	Aminosäure-N. mg%	Dest-säure (N/50. NaOH) cc.	Rest-N. mg%
I	Vor	0,44	0,28	62,76	—
	Nach	—	3,08	48,09	—
II	Vor	2,80	0,56	65,66	—
	Nach	0,28	2,04	33,72	—
III	Vor	2,24	0,56	55,20	1,9
	Nach	0,56	7,84	29,10	3,6
VI	Vor	8,40	1,12	70,15	0,7
	Nach	3,64	5,39	47,56	0,8
V	Vor	3,92	0,56	57,55	4,4
	Nach	1,40	4,20	35,97	8,8
Durchschnitt.	Vor	4,70	0,62	62,26	2,3
	Nach	1,46	4,51	38,80	4,4

Der Harnstoff-N, der im Vorblute auf 4,70 mg% sich belief, verminderte sich nach der Durchblutung des Darmes einen bestimmten Zeitraum lang bis auf 1,46 mg%, wogegen der

Ammoniak-N von 0,62 mg% nach der Durchblutung bis auf 4,51 mg% stieg. Der Grad der Mengenschwankung der Substanzen war dreifach so gross, wie in den Kontrollversuchen. Der Grund dafür ist nicht klar, aber aus dem Resultate wird angenommen, dass der Dünndarm in Gegenwart von Glykokoll in seiner Tätigkeit gefördert wurde.

Bezüglich der Aminosäure verminderte sich der Amino-N von 62,26 mg% nach der Durchblutung bis auf 38,89 mg%. Rechnet man den N zu Glykokoll um, so ging das Glykokoll auf 0,3706 g in der absoluten Menge in der Darmwand verloren. Wenn das verlorene Glykokoll unter dem Vorgang der Desaminierung in eine Fettsäure umgewandelt wäre, müsste die Menge der destillierbaren Säure beträchtlich gross sein, wogegen sie in Wirklichkeit ganz gering war. Nämlich die im Nachblute vermehrt gefundene Fettsäure in 10 cc. des Blutes entsprach dem Wert von 2,1 cc. von der N/50-Lösung, also 63 cc. derselben in ganzen. Auf der anderen Seite war der gefundene Ammoniak-N in der Menge zu gering, um den N des verlorenen Glykokoll aufzufüllen. Das Glykokoll dürfte durch einen komplizierten Chemismus in der Darmschleimhaut sich in andere Substanzen umwandeln. Aber wenn dies der Fall wäre, sollte der R-N. im Blute nach der Durchblutung auch unverändert bleiben, wogegen der R-N., der im Vorblute durchschnittlich auf 82,6 mg% sich belief, sich nach der Durchblutung bis auf 64,4 mg% verminderte. Der Verbleib des Glykokolls muss also in anderer Richtung gesucht werden. In diesen Experimenten wurde die Tatsache beobachtet, dass die destillierbare Säure durch die Durchblutung des Darmes mit Glykokoll im Blute sich vermehrte, wenn die Menge sehr gering war. Aus diesem Ergebnisse kann als höchst wahrscheinlich angenommen werden, dass das Glykokoll in der Darmwand in ganz geringer Menge zersetzt wurde und die destillierbare Säure bildete.

## II.

Der zur Durchblutung gebrauchte Teil war ein oberer Abschnitt des Dünndarmes. Dieser Teil des Darmes ist eigentlich inbezug auf die Resorption sehr tätig, wogegen die Sekretion



mangelhaft ist. Also ist die Möglichkeit fast ausgeschlossen, dass das Glykokoll im Blute in den Darmlumen mit dem Darmsaft secerniert wird. Wirklich war das Sekret bei der Durchblutung sehr gering. Bei den Versuchen der Magendurchblutung mit Leucin (5) und mit Histamin (6) wurden sie immer in einer bestimmten Menge in der Schleimhaut und in der Muskelschicht vorgefunden. Also dürfte das Glykokoll auch bei der Durchblutung des Darmes in seiner Wand sich ablagern. Um dies zu untersuchen, wurde das Darmstück nach der Durchblutung mit physiologischer Kochsalzlösung durchströmt, bis die Waschlösung keine rötliche Verfärbung mehr zeigte. Die Schleimhaut wurde mit stumpfem Messer von der Muskelschicht getrennt. Die Darmstücke von 5 Versuchsfällen wurden zusammen bearbeitet. Die Muskelschicht wog zusammen 151,0 g und die Schleimhautschicht 178,0 g. Die Beiden Portionen wurden mit siedendem Wasser erschöpfend extrahiert. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck bis zu Syrup eingengt. Der Syrup wurde verestert. Aus Esterchlorhydrat wurde das Glykokoll befreit. Die Identifizierung des Glykokolls geschah durch Kupferos- wie Krystallwasserbestimmung des Kupfersalzes.

#### *Krystallwasserbestimmung:*

0,1574 g Substanz wog 0,1460 g nach Erhitzen im Trockenschrank unter 130°C.

Ber. für  $(C_2H_4NO_2)_2Cu + H_2O$ : 7,25%.

Gef. : 7,84%.

#### *Kupferbestimmung:*

0,1460 g Substanz lieferte 0,0546 g CuO.

Ber. für  $(C_2H_4NO_2)_2Cu$ : 29,68%.

Gef. : 29,99%.

In den Kontrollversuchen konnte ich keine freie Aminosäure in der Schleimhaut sowie in der Muskelschicht beobachten. Im Hauptversuche bekam ich 0,8736 g Glykokoll aus der Muskelschichtportion und 0,6090 g aus der Schleimhautportion. Das Glykokoll der beiden Portionen betrug also zusammen 1,4826 g, welches aus



TABELLE III.  
Belastungsversuche mit Glykokoll (ca. 1 g).

Versuchs-Nr.	Versuchs-Trg.	Durchblutungs-dauer St.	Durchblutungs-blutmenge cc.	Druck mm Hg		Harnstoff-N mg%	Ammoniak-N mg%	Aminosäure-N mg%	Rest-N mg%
I	30/IV	2,0	300	25	{ Vor	3,36	0,84	85,58	89,6
					{ Nach	2,80	2,80	63,28	72,8
II	5/V	3,0	300	25	{ Vor	4,48	1,12	113,57	131,6
					{ Nach	1,96	8,96	96,37	123,2
III	9/V	3,0	300	25	{ Vor	5,60	1,12	69,77	86,8
					{ Nach	3,36	7,84	43,81	67,2
IV	12/V	3,0	300	25	{ Vor	5,32	0,56	84,75	86,8
					{ Nach	2,24	3,64	48,03	61,6
V	17/V	2,5	300	30	{ Vor	10,92	1,96	61,91	78,4
					{ Nach	1,40	12,32	49,42	68,6
Durchschnitt.					{ Vor	5,94	1,14	83,18	94,6
					{ Nach	2,37	7,11	60,16	78,7

den 5 Stücken des Darmes herauskam. Also wurde das Glykokoll in einem Stücke durchschnittlich mit 296,52 mg zurückgefunden. Der Amino-N, der sich im Vorblute auf 83,18 mg% belief, verminderte sich nach der Durchblutung bis auf 60,16 mg%. Die Differenz des Stickstoffes in beiden Konzentrationen betrug 23,02 mg auf 100 Teile des Blutes. Wird der Stickstoff zu Glykokoll umgerechnet, so ging das Glykokoll in der totalen Menge von 369,99 mg im Durchschnitte verloren. Nämlich der grösste Teil des verlorenen Glykokolls wurde in der Darmwand wiedergefunden, während das Glykokoll in einem kleinen Teile, d. h. in der Menge von ungefähr 73,47 mg, vermutlich bei der Durchblutung zersetzt wurde. Ich werde jetzt das Versuchsergebnis auch in bezug auf das Glykokoll betrachten, welches im Blute unzersetzt zurückblieb. Im Nachblute fand ich Amino-N 60,16 mg%, darunter befand sich der normaler Weise im Blute vorhandene Amino-N im Durchschnitte von 9,70 mg%. Also ist die Differenz der beiden

Amino-N, d. h. 50,46 mg% als Glykokoll-N zu betrachten. Wird der N zu Glykokoll umgerechnet, so wird das Glykokoll in 300 cc. vom Blute auf 811,0 mg zurückgewonnen. Das Glykokoll in einem Versuche, welches in der Muskelschicht, in der Schleimhaut sowie im Blute unzersetzt zurückblieb, betrug im ganzen 1,1075 g. Das zum Versuche ausgegangene Amino-N war im Blute nur 83,18 mg% enthalten, darunter 9,83 mg% von Amino-N, welches normalweise im Blute vorhanden war. Also ist 73,35 mg% des Stickstoffes als Glykokoll-N zu betrachten, was 1,1788 g vom Glykokoll entspricht. Nach dieser Betrachtung wurde das Glykokoll in der Menge von 71,30 mg zersetzt. Auf jeden Fall war das Glykokoll in der Darmwand schwer zersetzbar, während ein kleiner Teil desselben, d. h. ca. 71,30–73,47 mg im Durchschnitte, wahrscheinlich abgespalten wurde. In diesem Versuche wurde auch die Verschiebung des Stickstoffes von der Harnstoff-Fraktion nach der Ammoniak-Fraktion beobachtet, ganz genau wie ich in der 2-ten Mitteilung berichtete. Der N in der Ammoniak-Fraktion wurde durchschnittlich in der Menge von 2,40 mg% mehr als der N gefunden, welcher in der Harnstoff-Fraktion verloren ging. Der überschüssige N, d. h. 7,20 mg in der totalen Menge, muss von den sonstigen Muttersubstanzen herkommen, worunter das Glykokoll einbegriffen werden muss. In Glykokoll von 71,30–73,47 mg ist der N in der Menge von 13,31–13,71 mg enthalten. Wenn das Glykokoll wirklich in der Darmschleimhaut desaminiert wurde, musste das Glykokoll also an der Bildung des Ammoniak-N teilnehmen. Wenn man annehmen dürfte, dass die destillierbare Säure sämtlich aus dem Glykokoll herstammte, welches bei dem Hauptversuche im Destillat sich vermehrt vorfand, müsste das Glykokoll in der Menge von 94,6 mg im Durchschnitte zersetzt worden sein. Doch betrug das Glykokoll, welches in meinem Versuche verloren ging, nur 73,47–71,30 mg. also muss die Säure im Destillat von einer anderen Herkunft sein.

#### SCHLUSS.

1. Im Durchblutungsversuche des Dünndarmes mit Glykokoll war letzteres in der Darmwand schwer zersetzbar, wurde aber in

geringer Menge desaminiert, um destillierbare Säure einerseits und Ammoniak andererseits zu bilden.

2. Das Glykokoll, welches dem durchströmenden Blute zugesetzt wurde, wurde nach der Durchblutung nicht nur im Blute, sondern in der Muskelschicht sowie in der Schleimhaut des Darmes unzersetzt wiedergefunden.

3. Im Durchblutungsversuche des Dünndarmes stiegen der *N*-Wert in der Harnstoff-Fraktion im Blute ab und der *N*-Wert in der Ammoniak-Fraktion auf.

#### LITERATUR.

- Cohnheim, O. u. Makita, F. (1909): Zeitschr. f. physiol. Chem., **61**, 189.  
Effront, J. (1909): Compt. rend. de L'Acad. des Sc., **148**, 238.  
Effront, J. (1909): Moniteur scient. **23**, 1; Chem. Centralb. 1, 1663.  
Ikeda, G. (1934): Diese Zeitschr., **20**, 261.  
Ikebe, K. (1933): Diese Zeitschr., **17**, 275.  
Nawiaski, P. (1908): Arch. f. Hyg., **66**, 209.  
Salaskin, S. (1904): Zeitschr. f. Physiol. Chem., **42**, 410.  
Yoshida, Y. (1933): Diese Zeitschr., **17**, 261.

## DIE CHENSCHEN UNTERSUCHUNGEN DES DARMES.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. Midori Tsudji.)

### IV. Mitteilung.

#### Durchblutungsversuche des Dündarmes mit *d*-Alanin.

VON

GOICHI IKEDA.

(Aus der Inneren-Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 23. April 1934)

Die Leber wird als Hauptsitz für Desaminierung der Aminosäuren im Organismus betrachtet, während der Darm als von weniger grosser Bedeutung dafür angenommen wird (1929). In der vorigen Mitteilung berichtete ich, dass das Glykokoll in der Darmwand schwer zersetzbar ist, aber in geringer Menge an Ort und Stelle desaminiert wird, um einerseits destillierbare Säure und andererseits Ammoniak zu bilden. Während das Adenin in der Darmschleimhaut desaminiert wird, gibt es diesbezüglich keine Untersuchung mit Monoaminosäuren ausser meinem Versuche mit Glykokoll, dessen Ergebnis aber quantitativ nicht ausgezeichnet war. Da der Darm genetisch dem Magen sehr nahe steht, scheint die chemische Tätigkeit in gewissen Masse gemeinsam zu sein. Bei den Durchblutungsversuchen mit den beiden Organen ganz gleich verhielt sich nämlich der Harnstoff (1933). Schon früher wies Matsuoka beim Hundemagen die Desaminierungstätigkeit durch Durchblutungsversuche mit Alanin nach, indem er aus dem ausgeströmten Blute *d*-Milchsäure analysenrein gewann. Alanin wird schon bekanntlich in der Leber leicht in Milchsäure umgewandelt. Zu meinem Versuche sollte die Substanz auch sehr geeignet sein um zu prüfen, ob der Desaminierungsprozess wirklich in der Darmwandung vor sich geht.

Die Durchblutung wurde mit dem oberen Abschnitte des Dünndarmes ausgeführt, ganz genau wie in der III. Mitteilung. In den Kontrollversuchen wurde der R-N nach Durchblutung als

Regel immer in einer bestimmten Menge vermindert vorgefunden, wovon später noch die Rede sein wird. Der Harnstoff-N verminderte sich in der Menge von 0,98 mg% im Durchschnitte nach der Durchblutung, aber um ebensoviel wurde er in der Ammoniakfraktion vermehrt vorgefunden. Die Milchsäure, welche vor der Durchblutung 21,75 mg% betrug, wurde nach der Durchblutung in der Menge von 26,00 mg% vorgefunden. Im Hauptversuche verminderte sich der R-N im Blute nach Durchblutung in der Menge von 15,4 mg%; auf den Grund dazu wird unten ausführlich hingewiesen werden. Der Amino-N, welcher vor der Durchblutung 63,59 mg% betrug, wurde nach der Durchblutung auf 40,74 mg% reduziert vorgefunden, während im Kontrollversuche der Wert des Amino-N durch Durchblutung unverändert blieb, wie schon oben gesagt wurde. Also ging der Amino-N während der Durchblutung in der Menge von 22,83 mg% verloren. Die Milchsäure wurde im Nachblute in der Menge von 22,1 mg% mehr als im Vorblute vorgefunden. Die Milchsäure erwies sich polarimetrisch untersucht als *d*-Milchsäure. Im Kontrollversuche ohne Alanin beobachtete ich auch Vermehrung der Milchsäure in der Menge von 4,25 mg% im Nachblute. Die Milchsäure, welche im Hauptversuche mit *d*-Alanin wirklich neugebildet wurde, betrug also 17,85 mg auf 100 Teile Flüssigkeit. Wenn man annehmen darf, dass die Milchsäure aus dem *d*-Alanin herstammte, musste 17,57 mg Alanin auf 100 Teile Blut in Milchsäure umgesetzt werden, wobei 2,78 mg Ammoniak befreit werden sollte. Ich fand den N in der Ammoniakfraktion im Nachblute auf 3,0 mg auf 100 Teile Blut vermehrt, indem das Resultat im Kontrollversuche in Rechnung gezogen wurde. Der Überschuss des Ammoniaks musste aus anderer Quelle herkommen. Früher berichtete ich, dass der Harnstoff in der Darmwand einerseits in unbekannter Weise im Blut verloren geht und andererseits teilweise wahrscheinlich in Ammoniak umgewandelt wird, obgleich noch nicht bestätigt ist, ob die Urease sicher in der Darmwand existiert. Über die Frage des Ammoniaks, welcher bei der Durchblutung des Darmes vorgefunden wird, ist es nicht erlaubt mit nur diesem Versuche voreilig eingehend zu diskutieren. Wenn man den Amino-N, welcher beim



Versuche im Blute verschwand, als Alanin betrachtet, betrug er zu Alanin umgerechnet 147,95 mg auf 100 Teile Flüssigkeit. Also war das Alanin, welches in Milchsäure umgewandelt wurde, nur ein Bruchteil des Alanins, welches während der Durchblutung aus dem Blute verloren ging.

Ausserdem muss die Tatsache sehr merkwürdig erscheinen, dass der R-N des Blutes in der Menge von 15,4 mg auf 100 Teile verschwand. Bei den Durchblutungsversuchen des Darmes mit Glykokoll beobachtete ich (s. meine vorige Mitteilung), dass das Glykokoll in nicht geringer Menge in der Darmwand abgelagert sich befand. Das Verhalten war ganz ähnlich auch bei Durchblutung des Magens mit verschiedenen Substanzen. Nämlich untersuchte ich die Darmwand auf Alanin, indem die Untersuchung mit Darmstücken von 7 Versuchen zusammen vorgenommen wurde. Aus der Muskelschicht wurde das Alanin in der Menge von 0,1046 g und aus der Schleimhaut in der Menge von 0,1556 g rein isoliert und durch Analyse identifiziert. Also in einem Versuche lagerte sich das Alanin während der Durchblutung in die Darmwand in der Menge von 0,0371 g an. Aus dieser Tatsache war der Grund klargestellt, warum der R-N und der Amino-N im Blute nach der Durchblutung sich stark verminderten, wenn auch die gefundene Menge des Alanins zu gering war, um den verschwundenen Amino-N aufzufüllen. Wenn man annimmt, dass nicht nur Alanin, sondern auch andere N-haltige Substanzen im Blute während der Durchblutung in die Darmwand adsorbiert werden dürften, kann man leicht verstehen, dass im Kontrollversuche der R-N im Nachblute weniger als im Vorblute gefunden wurde.

Schlussfolgerung: das Alanin, welches durch die Dünndarmwand durchgeströmt wurde, wurde zum grösseren Teil auf unbekannte Weise umgesetzt, zu einem kleinen Teil in der Darmwand fixiert und zu einem anderen kleinen Teil zu *d*-Milchsäure umgewandelt.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuche wurde Hundedarm gebraucht. Die Durchblutungsanordnung geschah ganz genau wie in den früheren

Mitteilungen. R-N wurde nach Kjehldal, Harnstoff und Ammoniak nach Van-Slyke und Cullen, Aminosäure nach Van-slyke und Milchsäure nach Tanaka und Endo bestimmt. Die Durchblutung dauerte ungefähr 3 Stunden.

### I. Kontrollversuche.

Durchblutung des Dünndarmes ohne Alanin.

Versuchs-Nr.	Durchblutungs-dauer St.	Blutmenge ccm	Zeit	Rest-N mg%	Harnstoff-N mg%	Ammoniak-N mg%	Aminosäure-N mg%	Milchsäure mg%
I	3,0	300	Vor	—	7,28	0,56	12,56	—
			Nach	—	5,60	2,80	11,99	—
II	3,0	300	Vor	—	4,06	0,70	9,73	—
			Nach	—	3,78	1,54	8,59	—
III	3,0	300	Vor	33,6	3,36	0,84	7,60	—
			Nach	30,8	2,38	1,82	7,60	—
IV	3,0	300	Vor	61,8	—	0,56	9,43	—
			Nach	56,0	—	1,40	10,60	—
V	3,0	300	Vor	39,2	—	—	11,36	57,75
			Nach	36,4	—	—	11,93	33,75
VI	3,0	300	Vor	—	—	—	—	21,00
			Nach	—	—	—	—	25,50
V	3,0	300	Vor	—	—	—	—	16,50
			Nach	—	—	—	—	18,75
Durchschnitt.			Vor	44,9	4,90	0,67	10,14	21,75
			Nach	42,4	3,92	1,89	10,14	26,00

*II. Hauptversuche.*

## Durchblutung des Dünndarmes mit Alanin.

Versuchs-Nr.	Datum	Durchblutungs-dauer St.	Blutmenge cem	Zeit	Rest-N mg%	Harnstoff-mg% N	Ammoniak-N mg%	Aminosäure-N mg%	Milchsäure mg%
I	19/VII	1,5	300	Vor	67,2	6,44	1,12	46,28	15,00
				Nach	58,8	3,64	3,08	34,85	31,50
II	25/ „	1,5	300	Vor	78,4	11,84	1,12	62,07	30,00
				Nach	64,4	8,12	4,48	50,09	50,41
III	30/ „	3,0	300	Vor	84,0	7,84	1,12	86,64	17,25
				Nach	70,0	2,80	6,72	53,64	24,00
IV	5/VIII	3,0	300	Vor	75,6	7,84	0,84	60,99	24,75
				Nach	56,0	3,64	5,88	39,21	71,25
V	7/IX	3,0	300	Vor	70,0	3,64	1,12	59,78	22,50
				Nach	56,0	0,84	4,48	35,98	42,75
VI	13/ „	3,0	300	Vor	72,8	6,16	1,12	66,37	17,25
				Nach	57,4	1,40	6,72	39,38	—
VII	19/ „	3,0	300	Vor	78,4	8,12	0,84	63,00	—
				Nach	56,0	5,32	5,32	32,06	39,75
Durchschnitt.				Vor	75,2	7,41	1,04	63,59	21,13
				Nach	59,8	3,68	5,24	40,74	43,23

*III. Isolierung der Milchsäure.*

Blut, welches mit Alanin durchgeströmt worden war, wurde mit Schenk's Lösung gefällt und filtriert. Das Filtrat wurde mit  $H_2S$  behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde durchlüftet, unter vermindertem Druck in eine kleine Menge eingengt, indem die Flüssigkeit mit Natriumcarbonatlösung bis zu schwach saurer Reaktion neutralisiert wurde, weil sonst die Milchsäure in stark saurer Reaktion zu Aldehyd umgewandelt werden kann, und filtriert. Das Filtrat wurde im Vacuum bis zu Syrup eingengt und dann mit 95%igem Alkohol erschöpfend extrahiert. Der Alkoholextrakt wurde in Vacuum bis zum Syrup eingengt, mit Alkoholanhydrid versetzt und abgenützt, um die Salze zu entfernen. Das Filtrat wurde im Vacuum in eine kleine Menge

eingengt, mit Wasser versetzt und wiederum im Vacuum eingengt, wodurch keine Spur von Alkohol mehr darin zurückblieb. Der Syrup wurde mit Wasser aufgenommen, mit Phosphorsäure sauer gemacht und mit Äther 72 Stunden extrahiert. Der Äther wurde verjagt. Der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, mit Überschuss von Bleioxyd versetzt,  $\frac{1}{2}$  Stunde erwärmt und filtriert. Das Filtrat wurde mit  $H_2S$  behandelt, um das überschüssige Bleioxyd zu beseitigen, und filtriert. Aus dem Filtrat wurde  $H_2S$  verjagt. Die Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade eingengt, mit Zinkoxyd versetzt und  $\frac{1}{2}$  Stunde erwärmt, filtriert und bis zu kleinen Volumen abgedampft, wodurch das Zinksalz der Milchsäure krystallinisch gewonnen wurde. Aus dem Blute, welches in der Menge von 2 l ausging, bekam ich die Milchsäure als Zinksalz in der Menge von 0,9826 g.

*Krystallwasserbestimmung:* 0,2194 g Substanz wog 0,1924 g nach Erhitzen im Trockenschrank unter  $115^\circ C$ .

Ber. für  $(C_3H_5O_3)_2Zn + 2H_2O$ : 12,89%.

Gef. : 12,31%.

*Analyse:* 0,0504 g Substanz lieferte 0,0468 g  $CO_2$  und 0,0238 g  $H_2O$ .

	C	H
Ber:	25,76%	5,05%
Gef:	25,34%	5,29%

*Optische Untersuchung.* Eine wässrige Lösung im Gesamtgewicht von 25,0113 g, welche 0,2650 g Substanz enthielt, drehte bei  $28^\circ C$  im 1-Dm-rohr mit Natriumlicht 0,07 nach links. Spec. Gewicht 1,005. Mithin  $[\alpha]_D^{25} = -6,58$

#### IV. Isolierung des Alanins und der Milchsäure aus der Darmwand.

Die Darmwand, welche mit Alanin durchströmt worden war, wurde auf Alanin und Milchsäure untersucht. Die Darmstücke von 7 Versuchen wurden zusammen behandelt. Als Trockensubstanz bekam ich 95 g in der Muskelschicht und 77 g in der Schleimhaut.

Jede Portion wurde mit Wasser versetzt, unter Anwendung des Rückflusskühlers 10 Stunden gekocht. Der wässrige Extrakt wurde mit Phosphorwolframsäure behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde mit Baryt versetzt und filtriert. Das überschüssige Baryt des Filtrates wurde durch Durchleiten von Kohlensäure beseitigt und filtriert. Das Filtrat wurde in Vacuum bis zu ca. 50 cc. eingeengt und in saurerer Reaktion mit Schwefelsäure mit Äther 72 Stunden erschöpfend extrahiert. Der wässrige Teil wurde auf Alanin und der Ätherteil auf Milchsäure untersucht.

Aus dem wässrigen Teil wurde das Alanin als Alaninesterchlorhydrat isoliert, welches nach dem Verfahren von Esterfreiheit ausgearbeitet wurde, um das Alanin rein zu bekommen. Ich bekam die Substanz in der Menge von 0,1045 g aus der Muskelportion und in der Menge von 0,1556 g aus der Schleimhautportion. Die beiden wurden in Kupfersalz umgewandelt.

*Krystallwasserbestimmung:* 0,0940 g Substanz wog 0,0878 g nach Erhitzen bei 130°–140°C.

Ber. für  $\text{Cu}(\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}_2)_2 + \text{H}_2\text{O}$ : 7,0%.

Gef. : 6,5%.

*Schmelzpunktbestimmung:* Die Substanz schmolz bei 245°C.

*Kupferbestimmung:* 0,0878 g Substanz lieferte 0,0288 g CuO.

Cu

Ber.: 26,52%.

Gef.: 26,20%.

Der Ätherteil wurde auf Milchsäure untersucht, welche als Zinksalz rein isoliert wurde. Doch war die Menge des Salzes sehr gering.

#### LITERATUR.

- Borstein (1929): Bioch. Zeitschr., 214, 374.  
Ikeda (1934): Diese Zeitschr., 20, 271.  
Matsuoka (1933): Diese Zeitschr., 17, 267.  
Sumida (1934): Diese Zeitschr., 19, 449.





## BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

(Directed by Assistant Professor H. Masamune).

### IX. On the Fermentation of Chondroitinsulfuric Acid by *B. Pyocyaneus* and on Pyocyanine.

By

TORAZO MIYAZAKI.

(From the Medico-chemical Institute, Kyushu Imperial University, Fukuoka.  
Director: Professor K. Kodama.)

(Received for publication, May 7, 1934)

Neuberg and Hoffmann (1932) suggested, but without any details, that an enzyme specimen is to be obtained, which splits off sulfuric acid and a reducing substance from chondroitinsulfuric acid. The writer's observation, however, does not agree with them in regard to the presence of the chondrosulfatase, although the production of a reducing substance by this microbe was distinctly proved as well as by streptococcus hemolyticus and a staphylococcus flavus.

The present experiment shows, furthermore, that the acid is a suitable source of pyocyanine, the absorption spectrum of which will be given also in this paper.

#### EXPERIMENTAL.

##### A. On chondro-carbohydrase and-sulfatase.

The original culture of *B. pyocyaneus* employed in this experiment was supplied by Dr. M. Oyama da in the Bacteriological Institute who isolated it freshly from a blue pus in otitis media, from which sub-cultures were made.

1 cc. of 15 hours nutrient bouillon culture (1% of Liebig's meat extract, 1% of peptone and 0.5% of salt) of microbe was inoculated to a series of a mixture which was composed of 0.2 gm. sod. chondroitinsulfate, prepared according to Jorpes (1929), and 9 cc. of 0.85% saline solution, and was sterilised by autoclaving

The incubation mixture became turbid and viscous after 15 hours with the production of a characteristic blue pigment. When a colony on the nutrient agar was dropped into the chondroitinsulfate-NaCl solution, the organism did not proliferate, and when the nutrient bouillon culture was mixed with ninefold volume of the physiological saline solution, the mixture became turbid but no pigmentation occurred.

The reaction of the medium in the main experiment shifted during incubation to a feeble alkaline. As to the medium reaction, a comparison was made by mixing together 2 cc. of the nutrient bouillon culture, 17 cc. of 0.85% saline solution, 0.4 gm. chondroitinsulfate and 1 cc. of the acetate buffer (Walpale, pH 5.6). pH of the solution was 6.2 when mixed and 6.4 after incubation for one week, but pigmentation was still observed, though in a less degree.

The reduction power of the incubation mixture before and after acid hydrolysis, and the sulfate set free were estimated, taking two tubes at one time, as follows:

*1. The reduction power of the mixture:*

After being sterilised by heating for 5 minutes in a boiling bath, the mixture was diluted ten times with water, then filtered, and 1 cc. of the filtrate was pipetted into a big test tube containing 11 cc. water and then added to with 4 cc. of 0.005 n ferrieyanide solution. The mixture was treated further as Masamune (1933) described.

*2. The reduction power after acid hydrolysis.*

0.2 cc. of the tenfold diluted fermentation mixture was added with 8 cc. of 1 n HCl acid sol. and hydrolysed by heating for 30 minutes under the reflex condensor, cooled, neutralized with 4 cc. of 2 n NaOH solution and added to, furthermore, with 4 cc. of the ferrieyanide solution. The further procedures are the same as in 1.

*3. The freed sulfate.*

The total filtrate of the diluted fermentation mixture, plus washings, were acidified with 20% acetic acid, boiled, added to

with  $\text{BaCl}_2$  solution, filtered after 24 hours standing and ignited with the filter.

As control experiments, the above medium without the microphyte (control exp. I) and the mixture composed of chondroitinsulfate and saline sol. (control exp. II) were treated similarly, but in these cases no formation of the reducing substances and free sulfate was proved.

The result of a typical experiment is indicated in table I.

TABLE I.

			Incubation (days)					
			1	2	4	7	9	11
Quantity of 0.005 n ferricyanide sol. reduced (cc.)	by 1 cc. of the diluted mixture	With B. Pyocyaneus	0.02	0.63	0.66	0.65	0.65	0.66
		Control exp. I.	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
		Control exp. II.	0	0	0	0	0	0
	by 0.2 cc. of the diluted mixture (after acid hydrolysis)	With B. Pyocyaneus	1.70	1.64	1.65	1.64	1.66	1.66
		Control exp. I.	1.69	1.69	1.70	1.69	1.69	1.70
		Control exp. II.	1.61	1.60	1.60	1.61	1.60	1.59
	Sulfate set free as $\text{BaSO}_4$ (mgm.)	With B. Pyocyaneus	—	0.0024	0.0026	—	0.0018	0.0028
		Control exp. I.	—	0.0022	0.0028	—	0.0020	0.0028
		Control exp. II.	—	0.0026	0.0024	—	0.0022	0.0026

The reduction power reached the maximum at the 4th day of incubation and remained constant. The cleavage of the sulfate residue was not affirmed. No evolution of  $\text{H}_2\text{S}$  gas was also detected with the lead paper.

For a comparative study, *staphylococcus flavus* and *streptococcus haemolyticus* (the writer is indebted again to Dr. M. Oyama for supplying the fresh original cultures) were let act upon chondroitinsulfuric acid under the same conditions, and the similar production of a reducing substance was observed as given in table II.

TABLE II.

Quantity of 0.005 n ferricyanide sol. reduced (cc.)			by 1 cc of the diluted mixture	by 0.2 cc of the diluted mixture (after acid hydrolysis)
{	Incubation mixture with <i>B. pyocyaneus</i>	before incubation	0.02	1.70
		after 1 week	0.73	1.66
	With <i>Staphylo-coc.</i>	before incubation	0.02	1.70
		after 1 week	0.75	1.67
	With streptococ.	before incubation	0.02	1.70
		after 1 week	0.66	1.62

*B. On pyocyanine.*

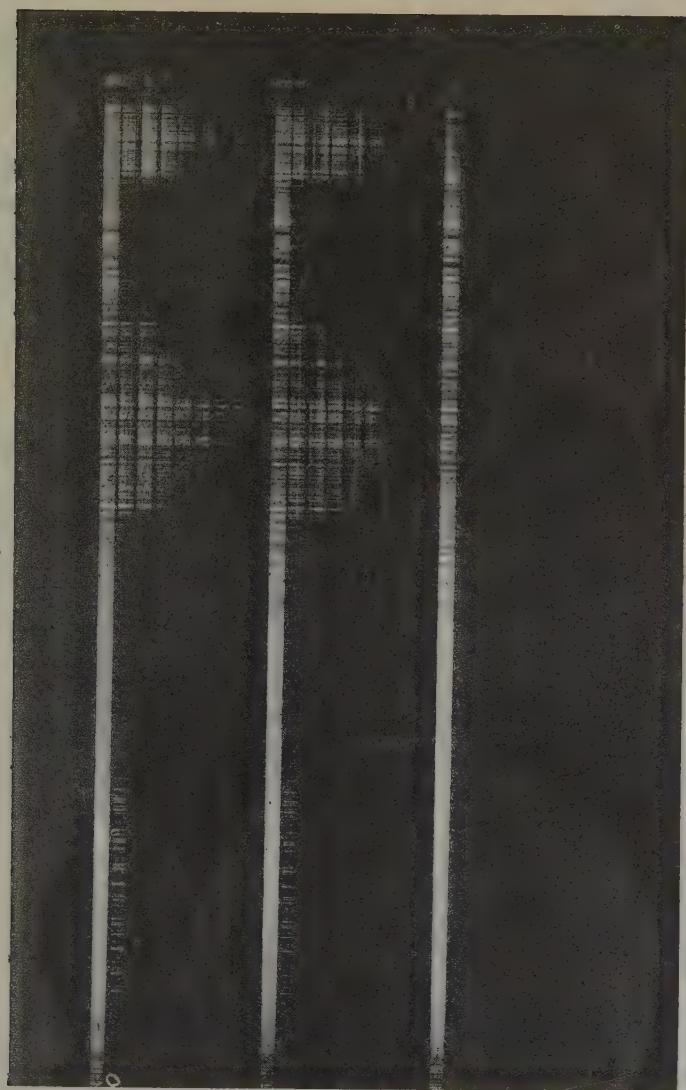
In order to identify the blue pigment produced from chondroitinsulfuric acid as pyocyanine, it was prepared on one hand, by inoculating 10 cc. of the nutrient *B. pyocyaneus* culture into 100 cc. of chondroitinsulfate-NaCl solution (5 gm. in 100 cc. physiolog. saline sol.) and pyocyanine was, prepared on the other hand, by inoculating 20 cc. of the culture into 200 cc. of the nutrient bouillon.

After incubation for 5 days at 37°C, both mixtures were sterilized and the pigment isolated according to Mc Combie and Scarborough (1923) with a minor modification (the chloroform extract was shaken with 0.1 n HCl instead of 1% sulfuric acid.). The chloroform- and acid-extraction was repeated twice and the chloroform extracts the third time were combined and condensed under the reduced pressure at 22-25°C, after being dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

The production of the pigment arrived at maximum on the third day of incubation with chondroitinsulfuric acid and on the fifth day with the nutrient bouillon, and the yield in the above preparation was nearly equal in both cases, namely, 12 mgm from 50 gm. of the former and 70 mgm from 6 liters of the latter. The crude products were recrystallised from a little hot water (about 1 cc. water to 10 mgm). Both of the products melted at 127°C and no depression of the mixed melting point was observed. The



Fig. 1



Pyocanine ↑

↑  
The pigment  
from chondroitin-  
sulfuric acid.

identity of both products was further proved by the spectrophotograph.

*Spectrophotograph of the products.*

Solutions of the product in 0.1 n HCl were diluted to the colour depth of 10 mg. p.c. fuchsine solution and spectrographs were taken, (for which the writer expresses sincere gratitude to Dr. R. Itoh). Fig. 1. proves that both are perfectly identical and reveals three absorption bands, the peaks being at 4700, 3800 and 2750 Å.

SUMMARY.

1. *B. pyocyaneus* has a chondrocarbohydrase as well as streptococcus haemolyticus and staphylococcus flavus have.
2. No chondrosulfatase was proved to be present in *B. pyocyaneus*.
3. Chondroitinsulfuric acid is a suitable source of pyocyanine.
4. The spectrophotograph of pyocyanine in hydrochloric acid reveals three absorption bands at 4700, 3800 and 2750 Å

The writer is indebted to Professor K. Kodama for kind criticisms, to Dr. I. Kubo, Professor of Otorhinolaryngology, for continuous encouragement and to Assistant Professor H. Masamune for direction in the course of this investigation.

REFERENCES.

- Jorpes, E. (1929): B. Z., **204**, 354.  
Masamune, H. (1933): J. Biochem., **18**, 259.  
McCombie, H. and Scarborough, H. A. (1923), J. of the chem. Soc., **123**, 3279.  
Neuberg, C. u. Hofmann, E. (1932): B. Z., **252**, 434.

## BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

(Directed by Assistant Professor H. Masamune).

### X. The Fate of Glucosamine in the Animal Body.

By

KINJI KAWABE.

(From the Medico-chemical Institute, Kyushu Imperial University, Fukuoka.  
Director: Professor K. Kodama.)

(Received for publication, May 7, 1934)

The fate of glucosamine in the animal body, has been studied by many investigators, but the results seem rather conflicting. Fabian (1899), Cathcart (1903), were not able to find any deposit of glycogen in liver on administering this aminosugar per os to fasting rabbits. Masai and Nakamura (1926) confirmed this fact on rabbit but they found that in dog, synthesis of glycogen from glucosamine actually took place in liver, and furthermore, even in the case of rabbit, lactic acid was secreted in urine as in dogs, after ingestion of glucosamine chlorhydrate. They concluded therefore that glucosamine is probably converted into glucose by deamination and glycogen is built up from the latter.

The same conclusion was obtained also by Moschini (1924), who found that the hypoglycemic insulin syndrome could be avoided either by injection of glucosamine chlorhydrate 1 hour before insulin or by simultaneous administration per os in a larger dosis (8-10 gm.).

On the other hand, in the experiments of Baumgarten (1906), no increase of sugar secretion was observed in diabetic patients after ingestion of glucosamine chlorhydrate. Forschbach (1906), working with glucosaminecarbonic acid ethylester on pancreas-diabetic dogs, came to the conclusion that no glucose was formed in the body from this glucosamine derivative, even when a large quantity of it was decomposed, and suggested that the compound might be cleaved into erythrit and glycinester. Griffith (1930)

failed, however, to prove the formation of glycine, because glucosamine chlorhydrate showed no protective effect due to glycine on the toxic benzoate meal.

Stolte (1908) expressed the idea that glucosamine is condensed into fructosazine in the animal body, but without any decisive confirmation by experiments on rabbits. Meyer (1907) worked with accetylglucosamine on phlorrhizinized rabbits but the distintegration of this compound did not appear to proceed through glucose as an intermediary stage (the substance was given per os.)

Masai (1918) investigated the effect of glucosamine chlorhydrate on urine components of rabbits, fasting and normal, and found that urea nitrogen decreased to a greater extent than was covered by the increased amount of ammonia N. Aminoacid nitrogen was not effected. The total nitrogen fluctuated, but not in a definite direction, and was judged by the author to remain unchanged nearly always. From these quantitative relationships, he assumed that glucosamine nitrogen does not convert into urea; but at least a portion of it changes into an unknown nitrogen compound, which is eliminated through the kidney.

It is impossible now to reconcile these recorded experiments with any definite conclusion upon the fate of glucosamine in the animal body. The writer, therefore, repeated some of these investigations by new elaborated analytical methods, scrutinizing the experimental conditions, the results of which are reported in this paper.

#### CHAPTER I. GLYCOGENESIS FROM GLUCOSAMINE.

All of the previous observations on glycogenesis from the aminosugar were performed on fasting animals. By starvation, such building materials as glucose are supplied. Starvation is, when the liver loses most of the glycogen and regains it readily however, not the best experimental condition for this kind of study, because the glycogen content of the liver does not invariably become zero in rabbits or dogs after 4 days fasting. It depends much upon the duration of fasting, the feeding, and exercise of the animal prior to the starvation. Moreover, the animal is liable



to fall into acidosis by fasting, which causes deficient glycogenesis. For these reasons, the present work was carried out on normal grown up male rabbits, which were nearly equally old and weighed; and the whole experiment was carried out in winter, because Fujii (1924) pointed out that the glycogen of the rabbit liver shows seasonal variation.

The animals were fed for 6 days or longer on 150 gm. of bean curd refuse and 50 gm. of greens per kg. bodyweight and kept under conditions similar to one another, and used for the main experiment when the body weight attained to a certain level.

Glucosamine chlorhydrate were transferred subcutaneously in the proportion of 2 gm. per kg. bodyweight after being dissolved in 6 cc. water and neutralized with 2 N NaOH. Subcutaneous application was preferred to oral, because the aminosugar is not always absorbed perfectly from the alimentary tract.

The interval from sugar injection till glycogen analysis varied according to investigators. In the experiment of Fabian, this was 10, 11½ and 12 hours; in Cathcart's, 16 and 17 hours, and in Masai and Nakamura, 16 and 17 hours. In the writer's experiment, 1 and 2 hours were chosen, as K. Sato (1923) reported that glycogen was deposited in the liver of fasting rabbits ad maximum three hours after intravenous injection of glucose; and S. Sato (1931), that in the case of normal rabbits it reaches maximum 1 hour after injection into the auricular vein of glucose, mannose, 1-arbinose or of 1-xylose and returned to the normal value at the third hour in all sugars except glucose. Thus glycogen appears to be built up rapidly and then broken down soon, especially when such sugar is applied as is not so suitable for glycogenesis.

As the control experiment, an equivalent amount of glucose was injected after being dissolved in water containing NaCl, which corresponds to the quantity of this salt in the neutralized glucosamine solution. The volume of the glucose solution was also equal to that of glucosamine.

The experiments were started between 7° 30 and 8° 0 in the morning, with the injection, and the animal was killed after the mentioned period of time by bleeding from carotis and the whole



liver was weighed, minced quickly by means of a masticator; and then 10 gm. of the pulp were taken for analysis by the method of Iwasaki and Mori. As a fairly large portion of the injected glucosamine is retained in liver tissue as already reported by Kawabe (1934), its influence upon the glycogen value by this method was examined, namely, 10 gm. pulp of the liver from a normal rabbit (not injected with glucosamine) were mixed with 0.1 gm. glucosamine chlorhydrate and the mixture was analysed for glycogen content and the result was compared with that obtained by using the pulp alone. The results coincide well with each other.

As shown in table I. glycogen increased already in the first hour and more in the second when glucose was injected. In the case of glucosamine, the glycogen content was scarcely higher than normal after 1 hour, but the increase after 2 hours was distinct and nearly equal to that found at the first hour when glucose was injected.

It has been proved from this result that glucosamine serves as a source for glycogenesis in rabbit, although it is not absolutely disproved that glucosamine or its fragments may stimulate glycogensynthesis out of protein or fat. The failure of the recogni-

TABLE I.

a) Experiments on normal rabbits which were injected with neither glucosamine nor glucose.

Rabbit No.	Sex	Date of main experiment	Period of feeding of the definite diet before the main exp. (day)	Body weight on the day of main exp. gm.	Liver		
					Weight gm.	Glycogen	
						%	gm.
1.	♂	Jan. 23	6	2070	59.0	1.008	0.5947
2.	♂	" 26	8	2000	50.0	1.242	0.6214
3.	♂	" 27	6	2000	57.0	1.070	0.6009
4.	♂	" 29	8	2040	56.5	1.150	0.6490
5.	♂	" 30	7	2030	54.5	1.054	0.5744
6.	♂	Feb. 2	8	2040	52.0	1.122	0.5834

Average: 1.108 0.6039

b) Experiments on rabbits which were injected with glucosamine chlorhydrate neutralized with NaOH.

i) The animal was killed 1 hour after the injection.

Rabbit No.							
7.	♂	Jan. 31	8	2000	56	1.179	0.6602
8.	♂	Feb. 5	9	2000	53	1.150	0.6095
9.	♂	" 7	7	2050	57.1	1.210	0.6909
10.	♂	" 9	9	2000	55.5	1.364	0.7570
11.	♂	" 12	12	2100	52.7	1.105	0.5823

Average: 1.201 0.6599

ii) The animal was killed 2 hours after the injection.

Rabbit No.							
12.	♂	Feb. 1	10	2010	55.0	1.581	0.8695
13.	♂	" 3	7	2020	56.2	1.656	0.9306
14.	♂	" 6	7	2060	57.6	1.831	1.0546
15.	♂	" 8	8	2010	57.0	1.465	0.8350
16.	♂	" 10	6	2050	61.4	1.933	1.1858

Average: 1.693 0.9751

c) Exp. on rabbits which were injected with glucose + NaCl.

i) The animal was killed 1 hour after the injection.

Rabbit No.							
17.	♂	Feb. 13	6	2100	57.3	2.142	1.2267
18.	♂	" 14	7	2000	51.7	1.697	0.8773
19.	♂	" 16	6	2050	54.2	1.784	0.9669
20.	♂	" 20	7	2000	54.2	1.880	1.0180

Average: 1.875 1.0222

ii) The animal was killed 2 hours after the injection.

Rabbit No.							
21.	♂	Feb. 15	7	2030	51.3	2.961	1.5189
22.	♂	" 17	6	2000	51.0	2.281	1.1633
23.	♂	" 19	7	2010	53.4	2.442	1.3040
24.	♂	" 21	6	2010	56.7	2.209	1.2525

Average: 2.443 1.3096

tion of this fact by the previous authors might be ascribed to undue choice of time of glycogen analysis.

CHAPTER II. THE EFFECT OF GLUCOSAMINE ADMINISTRATION  
UPON THE OUTPUT OF LACTIC ACID AND THE DISTRIBUTION  
OF URINE NITROGEN.

*a) Subcutaneous application.*

A male rabbit was fed during the whole course of the experiment on the diet described in the foregoing chapter each day at between 11 and 12 a.m. After the animal was fed on this diet over 6 days, the 24 hours urine was collected quantitatively at 9 a.m. on the next three days, and the total nitrogen, ammonia- and urea-nitrogen, pH and the reduction power, were estimated. On the fourth day, the animal was injected with glucosamine chlorhydrate subcutaneously directly after the bladder was emptied and the urine of the following whole day was collected and analysed for glucosamine and lactic acid besides those above mentioned. The dosis and procedures of the injection were the same as are noted in Chapter I.

*Analytical methods:—*

*Total nitrogen:* By the Kjeldahl method on 5 cc. of urine.

*Ammonia:* By the Folin method on 25 cc.

*Urea:* By the Knop-Hüfner method on 0.5 cc.

*Glucosamine:* By the writer's method (1934, i) on 1 cc.

*Reduction power:* By the Benedict method, using 10 times diluted urine when glucosamine was administered, and not diluted in other cases.

*Lactic acid:* By the Fürth-Charnas method modified by Tanaka and Endo, using 20 cc. of urine.

*pH:* By the colorimetric method (Clark and Lubs).

In regard to lactic acid and the reduction power, control experiments were conducted, using either glucose-NaCl solution (control exp. I) or NaCl-solution (control exp. II) instead of glucosamine sol. as in Chapter I. In these control experiments, the analysis of urine before injection was restricted to one day as the urine components were proved to attain to the constant value

TABLE II.

Rabbit No. 25. ♂

The body weight remained in 2150 gm during the whole period of experiment.  
The animal was fed on the definite diet for 14 days before the urine collection was started.

Date	Urine volume cc.	pH	Total-N		NH <sub>3</sub> -N		Urea-N		Urine vol. req. for red. 10 cc of Benedict sol.		Glucosamin (free)		Lactic acid	
			%	gm.	%	gm.	%	gm.	cc.	(mgm)	%	mg. of N	%	gm.
Dec. 3-4	290	8.6	0.854	2.4766	0.0131	0.0379	0.7591	2.2013	33	(153.7)				
" 4-5	285	8.6	0.8624	2.4578	0.0134	0.0381	0.7693	2.1925	32.5	(153.3)				
" 5-6	280	8.6	0.8680	2.4304	0.0140	0.0392	0.7643	2.13	32.7	(149.8)				
Average:	285	8.6	0.8614	2.4550	0.0135	0.0384	0.7643	2.1781	32.7	(152.1)				
Dec. 6-7 <sup>1)</sup>	210	8.0	1.2936	2.7165	0.0224	0.0470	1.0856	2.2797	3.25	(1130.6)	0.4591	96.1	0.0753	0.0166 0.0348

Increase over the normal secretion:

 0.2615  
(93.4% of inj. N)

0.0096

0.1016

(978.2)

(28% of the total N. increased in urine)

1) 4.3 gm. of glucosamine chlorhydrate (0.28 gm. in terms of N) neutralized was injected subcut. at 9 a.m. Dec. 6.

Rabbit No. 26 ♂

The body weight remained in 2100 gm. during the whole period of experiment. The animal was fed on the definite diet for 16 days before the urine collection was started.

Date	Urine volume cc.	pH	Total-N		NH <sub>3</sub> -N		Urea-N		Urine vol. req. for red. 10 cc of Benedict sol.		Glucosamin (free)		Lactic acid	
			%	gm.	%	gm.	%	gm.	cc.	(mgm)	%	mg. of N	%	gm.
Dec. 8-9	280	8.6	0.8596	2.4068	0.0129	0.0361	0.7707	2.1579	32.5	(150.6)				
" 9-10	285	8.6	0.8568	2.4408	0.0131	0.0373	0.7561	2.1548	32.3	(151.1)				
" 10-11	280	8.6	0.8582	2.4029	0.0128	0.0358	0.7624	2.1347	32.5	(151.1)				
Average:	281.6	8.6	0.8582	2.4166	0.0129	0.0363	0.763	2.1480	32.4	(151.4)				
Dec. 11-12 <sup>2)</sup>	250	8.2	1.0724	2.6810	0.0173	0.0432	0.8981	2.2452	3.37	(1298)	0.4529	1132.2	0.0855	0.0101 0.0252

Increase over the normal secretion:

 0.2644  
(98% of the inj. N)

0.0096

0.0972

(1146.3)

(34.7% of the total N. increased in urine)

2) 4.2 gm. of glucosamine chlorhydrate (0.27 gm. in terms of N) neutralized was injected subcut. at 9 a.m. Dec. 11.

TABLE III.

## Controlexperiment I.

Rabbit No. 27 ♂

Body weight remained in 2100 gm during the whole period of experiment.

The animal was fed on the definite diet for 8 days  
until the urine collection was started.

Date	Urine volume cc.	pH	Urine required for reducing 10 cc of Benedict solution		Lactic acid	
			cc.	(mgm)	%	gm
Dec. 26-27	265	8.6	32.7	(161.9)		
„ 27 <sup>th</sup> -28	210	8.6	19.8	(212.1)	0.0013	0.0034

Increase above the value of  
normal secretion:

(50.2)

- 1) 3.52 gm of glucose (1.674 gm per kgm bodyweight) +0.651 gm. of NaCl (0.31 gm per kg bodyweight) in 10 cc water were injected subcut. at 9 a.m. Dec. 27.

Rabbit No. 28 ♂

Body weight remained in 2200 gm during the whole period of experiment.

The animal was fed on the definite diet for 8 days  
until the urine collection was started.

Dec. 26-27	270	8.6	32.8	(164.4)		
„ 27 <sup>th</sup> -28	230	8.6	22.1	(207.9)	0.0036	0.0097

Increase above the normal  
value of secretion:

(43.5)

- 2) 3.68 gm of glucose (1.674 g per kg body weight) +0.682 gm of NaCl (0.31 gm per kg bodyweight) in 10 cc water were injected subcut. at 9 a.m. Dec. 27.



TABLE IV  
Control experiment II.

Rabbit No. 29 ♂

Bodyweight remained in 2210 gm during the whole period of experiment.  
The animal was fed on the definite diet for 5 days  
until the urine collection was started.

Date	Urine volume cc.	pH	Urine required for reducing 10 cc. of Benedict solution cc.	Lactic acid	
				%	gm.
Jan. 14-15	270	8.6	32.7		
„ 15 <sup>th</sup> -16	260	8.6	32.7	0.0018	0.0048

1) 0.682 gm of NaCl (0.31 gm per kg bodyweight) in 10 cc. water was injected subcut. at 9 a.m. Jan. 15.

Rabbit No. 30 ♂

Bodyweight remained in 2100 gm. during the whole period of experiment.  
The animal was fed on the definite diet for 5 days until  
the urine collection was started.

Jan. 14-15	270	8.6	32.8		
„ 15 <sup>th</sup> -16	255	8.6	32.6	0.0022	0.0056

2) 0.351 gm. of NaCl (0.31 gm. per kg. bodyweight) in 10 cc. water was injected subcut. at 9. a.m. Jan. 15.

within 5 days of definite feeding.

The analysis of lactic acid of the normal rabbit urine was performed on four rabbits separately from the above series of experiments. The results are shown in table V. The average of daily secretion amounted to 0.0047 gm.

The results indicate that most (93.4% and 98%) of the nitrogen of the injected glucosamine was secreted in the following 24 hours and about 30% (28.8 and 34.7%) of the increase of total N was covered by the glucosamine-N. Although the extra-urea nitrogen amounted to nearly 40% (38.9 and 36.8%), the sum of the nitrogen belonging to glucosamine and the increased output of ammonia and urea in urine did not yet reach the total extra nitrogen, but 71.3% ( $=0.0753+0.1016+0.0096/0.2615$ ) in rabbit

TABLE V.

Body weight of each animal remained constant throughout the whole period of experiment.

Rabbit No.	Sex	Body-weight gm	Duration of feeding on the definite diet until the urine collection was made days	Date	Urine		
					urine volume cc.	lacticacid %	mg
31	♂	2170	7	Jan. 11-12	270	0.0015	0.004
32	♂	2200	7	" 11-12	265	0.002	0.0053
33	♂	1970	6	" 17-18	260	0.0017	0.0044
34	♂	2000	6	" 17-18	255	0.0021	0.0053
Average:					262.5	0.0018	0.0047

No. 25 and 72.8% ( $=0.0885+0.0972+0.0069/0.2644$ ) in rabbit No. 26. About 30% belong, therefore, to some other compounds.

The decrease of urine pH and elimination of lactic acid which will be noted later interpret the increase of ammonia output. In both examples, the elimination of lactic acid was 0.035 gm. and 0.025 gm. respectively. These quantities are distinctly larger than the normal value (0.0047 gm. in averages) and than that (0.0048 gm. and 0.0056 gm.) obtained in control experiment II (table IV)

TABLE VI.

Reduction power of glucosamine chlorhydrate on the Benedict solution.

Concentr. of the glucosamine chlorhydrate sol. %	Benedict sol. titrated cc.	Quantity of glucosamine chlorhydrate sol. used	
		cc.	mg.
0.1	10	21	21
0.05	5	20.7	10.35
0.04	4	21.0	8.4
0.03	3	20.8	6.24
0.02	2	20.7	4.14
0.01	1	21.2	2.12
0.005	0.5	22.0	1.1

where NaCl solution was injected instead of glucosamine-NaCl solution.

In order to calculate the glucosamine content of urine from the reduction power, a measured quantity of the Benedict solution was diluted to 25 cc. with water, added to with 10 gm. of sodium carbonate in crystal and a little tale and titrated with glucosamine chlorhydrate solution of various dilution, while the former was kept boiling (table VI).

Within the limits between 0.005 and 0.1 gm. 21 mg of the glucosamine chlorhydrate, containing 17.5 mg of the free aminosugar reduce 10 cc. of the Benedict solution.

The number in parentheses in Table II represents the reduction power as free glucosamine in mgm. It is seen that the amounts calculated from the reduction coincides fairly well with those obtained by colorimetry; in other words, no reducing substance was eliminated except glucosamine.

The control experiment I (table III) was performed because the aminosugar under investigation is assumed to be a derivative of glucose and accordingly the latter might be produced if it be deaminated in the body. The numbers in parentheses in the column of reduction power give the values calcul. as glucose. In this case a trace of glucose was secreted but the increase of lactic acid was scarcely detected.

#### *b) Oral application.*

The experimental conditions and methods are similar as in (a) but glucosamine chlorhydrate was wrapped in a thin wafer (0.07 gm.) and let ingest in dosis of 2 gm. per kg. of bodyweight.

In rabbit No. 35 table VII, 96% of the ingested nitrogen was eliminated through the kidney in the following 24 hours and in rabbit No. 36, 81%. In the former animal, absorption from the alimentary tract was almost complete and in the latter, seems less. The amount of nitrogen appeared in urine unchanged as the glucosamine was 15.7% and 15.1% ( $=0.0334/0.2215$ , calc. from the reduction power) respectively of the total extra nitrogen and much less than in the case of subc. application. The sum of extra

TABLE VII.  
Rabbit No. 35 ♂

Bodyweight remained constant (2070 gm) for the whole period of experiment. The animal was fed on the definite diet for 14 days until the collection of urine was started.

Date	Urine volume cc.	pH	Total N		NH <sub>3</sub> -N		Urea-N		Urine vol. required for reducing 10 cc of Benedict sol	Glucosamine (free)		Lactic acid	
			%	gm.	%	gm.	%	gm.		%	mgm N gm.	%	gm.
Dec. 14-15	285	8.6	0.4652	2.4658	0.0118	0.0336	0.7698	2.1939	32.3	(154.1)			
" 15-16	285	8.6	0.8624	2.4578	0.0115	0.0327	0.7660	2.1831	32.5	(153.31)			
" 16-17	290	8.6	0.8568	2.4817	0.0112	0.0324	0.7572	2.1958	32.7	(151.8)			
" Average	286.6	8.6	0.8614	2.4687	0.0115	0.0329	0.7643	2.1909	32.5	(153.9)			
Dec. 17 <sup>th</sup> -18	260	8.1	1.050	2.730	0.0151	0.0391	0.9918	2.3186	6.5	(669.9)	0.1998	0.5194	0.0403
increase over the normal secretion :			0.2620		0.0052		0.1277		(546.0)		(15.4% of the total N increased in urine)		

- 1) 4.2 gm. of glucosamine chlorhydrate (0.2734 gm. in terms of N), wrapped in wafer, were injected.  
No diarrhea was observed after ingestion.

Rabbit No. 36 ♂

Body weight remained constant (2100 gm.) for the whole period of experiment. The animal was fed on the definite diet for 16 days until the collection of urine was started.

Date	Urine volume cc.	pH	Total N		NH <sub>3</sub> -N		Urea-N		Urine vol. required for reducing 10 cc of Benedict sol	Glucosamine (free)		Lactic acid	
			%	gm.	%	gm.	%	gm.		%	mgm N gm.	%	gm.
Dec. 20-21	275	8.6	0.8075	2.4062	0.0112	0.0308	0.7761	2.1342	32.7	(146.8)			
" 21-22	275	8.6	0.8792	2.4145	0.0106	0.0291	0.7710	2.1202	32.9	(146.0)			
" 22-23	270	8.6	0.8820	2.3814	0.0109	0.0294	0.7721	2.0846	32.8	(143.9)			
" Average	273	8.6	0.8787	2.3988	0.0109	0.0297	0.773	2.1102	82.8	(145.2)			
Dec. 23 <sup>rd</sup> -24	255	7.9	1.0276	2.6203	0.0148	0.0377	0.8821	2.2493	7.3	(571.9)	0.0072		0.0183

increase over the normal secretion : 2.2215  
(81.0% of the N transferred)  
426.4 as glucosamine.  
(corresponds to 0.0334 gm of N)

- 2) 4.2 gm. glucosamine chlorhydrate (0.2734 gm. in terms of N) were ingested, wrapped in wafer.  
No diarrhea was observed after ingestion.
- 3) The colour development was not sufficient for comparison.

TABLE VIII.

Rabbit No. 37 ♂

Bodyweight remained in 2200 gm during the whole period of experiment.

 The animal was fed on the definite diet for 8 days  
until the urine collection was started.

Date	Urine volume cc.	pH	Urine required for reducing 10 cc. of Benedict solution		Lactic acid	
			cc.	(mgm)	%	gm.
Jan. 9-10	280	8.6	32.8	(170.5)		
„ 10 <sup>11</sup> -11	270	8.6	32.5	(166.0)	0.0027	0.0075

-3.5

1) 3.68 gm of glucose was wrapped in wafer and ingested at 9 a.m. Jan. 10.

Rabbit No. 38 ♂

Bodyweight remained in 2170 gm during the whole period of experiment.

 The animal was fed on the definite diet for 6 days  
until the urine collection was started.

Jan. 9-10	270	8.6	33.0	(163.6)		
„ 10 <sup>21</sup> -11	265	8.6	32.8	(161.3)	0.0022	0.0059

-2.3

2) 3.63 gm of glucose was wrapped in wafer and ingested at 9 a.m. Jan. 10.

ammonia- and ureanitrogen and glucosamine nitrogen was 66.1% ( $=0.1732/0.2620$ ) and 81.5% ( $=0.0334+0.1391+0.0080/0.2215$ ) and the ratio of the urea nitrogen to the total nitrogen 0.487 ( $=0.1277/0.2620$ ) and 0.628 ( $=0.1391/0.2215$ ) respectively. Namely, more glucosamine-nitrogen is converted into urea than when injected subcutaneously, but the sum of the nitrogen belonging to these three compounds does not yet fill up the total extra-nitrogen and less by ca. one fourth of the latter. The shift of pH toward the acid side is more than that in (a). What was said in (a) on lactic acid and reduction power is valid here also, although the excretion of lactic acid seems to be a little less.



In the control experiment (table VIII) with glucose, no secretion of either glucose or lactic acid was detected.

### CHAPTER III. LACTIC ACID IN BLOOD AFTER SUBCUTANEOUS INJECTION OF GLUCOSAMINE.

One of the prominent figures in the previous experiments is the appearance of lactic acid in urine by glucosamine injection, while glucose hardly caused it. This difference in both sugars might be ascribed either to the higher lactic acid content in blood or to the increased output of lactic acid by kidney tissue from glucosamine. The following experiment was made with the intention to decide this point. 21 cc. of blood were drawn by cardiac puncture at 9 a.m.; glucosamine was applied subcutaneously, soon after it, in the manner as above described, and the same amount of blood was collected again 2 hours later. For analysis of lactic acid 20 cc. of blood was used according to K. Sudo.

The control experiments were made by injection of NaCl or of glucose + NaCl. The dosis and procedures are similar as described in exp. of Chapter II a. (Table IX).

The time interval of 2 hours was chosen for the reason that at this stage glycogen was found deposited distinctly in liver. Table IX indicates that lactic acid content was elevated by glucose and also by glucosamine injection, but it was not changed by drawing a fairly large volume of blood, the extent of increase in both cases being similar to each other. Therefore, the cause of appearance of lactic acid in urine is most probably to be sought in the kidney.

### DISCUSSION.

It would be still premature to draw any definite conclusion, but the results suggest possibilities of mechanism in glucosamine decomposition in the animal body.

As Masai described, lactic acid is formed from glucosamine. We are concerned with how the acid is produced from this amino-sugar. Lactic acid is, as is well known, an important intermediary

TABLE IX.

Rabbit No.	Sex	Body weight gm.	Date	The duration of feeding on the definite diet before the main exp. (day)	Lactic acid		
					before	2h after injection	
39	♂	2050	Feb. 21	6	0.351	0.0353	inj: 0.635 gm. NaCl in 10 cc. water.
40	♂	2000	" 22	6	0.0306	0.0312	inj: 0.62 gm. NaCl in 10 cc. water.
41	♂	2100	" 26	7	0.0309	0.0501	inj: 3.515 gm. glucose and 0.65 gm. NaCl in 10 cc. water.
42	♂	2000	" 27	6	0.0268	0.0370	inj: 3.348 gm. glucose and 0.62 gm. NaCl in 10 cc. water.
43	♂	2100	" 28	7	0.0287	0.0427	inj: 4.2 gm. glucosamine chlorhydrate, neutralized with NaOH, total volume: 11 cc.
44	♂	2050	March. 1	7	0.0268	0.0504	inj: 4.1 gm. glucosamine chlorhydrate, neutralized with NaOH, total volume: 11 cc.

product of sugar metabolism, although fat and protein can not be excluded as its origin. If the glucosamine administered at the first stage be deaminated into glucose, the lactic acid will be naturally produced from it after the preliminary fission into two molecules of methylglyoxal. The interpretation encounters no difficulty. On the other hand, however, it is a well established fact that ammonia formed by deamination of amino acids is converted almost quantitatively into urea for the purpose of detoxication. Therefore, if the above conception be valid, the increase of the total nitrogen minus the aminosugarnitrogen in urine should be nearly filled up with the increment of urea nitrogen. The experiment reveals that it is not the case.

The suggestion of Stolte (1908) that glucosamine is converted into fructosazine and as such excreted into urine seems untenable, because on the urine of rabbits treated with glucosamine, the iron vitrol reaction for fructosazine resulted negatively, both

in alkaline reaction and after the urine was neutralized.

Another probable effect on glucosamine administered might be acetylation in the body. This can be proved easily as acetyl-glucosamine can be detected by the colorimetric method as well as glucosamine itself is. A number of rabbits were treated with a larger quantity (4 gm. per kg. bodyweight) of glucosamine chlorhydrate perenterally and the urines were tested. In one case, a faint coloration with the Ehrlich reagent was observed after vigorous boiling with alkali of the dried up residue of urine which had been treated as in analysis of glucosamine. Hence acetylation of glucosamine seems not to be completely excluded.

Lastly, the most probable event is the direct fission of the aminosugar into one C-compound containing nitrogen, and the other, free from it. From the latter, lactic acid may be produced, and the former may be deaminised partly, thus giving rise to the increase of urea and ammonia in urine, and partly excreted per se into urine corresponding to the extra nitrogen minus the sum of nitrogen belonging to the aminosugar, ammonia and urea.

The writer's experimental results stand in favour of this mechanism.

Further, on the basis of this mechanism, one can explain easily the glycogenesis and the depressing effect of glucosamine on the insulin syndrome (Moschini), since glucose and accordingly glycogen, are synthesized from lactic acid readily in the body. The fact that lactic acid appears in urine when glucosamine is administered, notwithstanding the fact that its concentration in blood is similar to that when an equivalent amount of glucose is given, and in the latter case not any or a trace of it, if at all, is found in urine, is due probably to the kidney function. In this regard it is interesting to refer to the work communicated already (Kawabe 1934, ii and iii) that the kidney is one of the organs rich in the enzyme which decomposes glucosamine.

#### SUMMARY.

Upon the fate of glucosamine administered to normal rabbits, the following points were noticed.

1. Glycogenesis was observed, but to a less extent than when the amount of glucose equivalent to glucosamine was given.

2. The glucosamine is secreted partially into urine. Ammonia- and urea-nitrogen increased also in urine but the sum of the increments of ammonia-, urea- and aminosugarnitrogen did not reach the amount of the total extranitrogen.

No reducing substance except glucosamine was eliminated in urine under the experimental conditions adopted.

3. Lactic acid was secreted into urine, when glucosamine was administered, but not at all when equivalent glucose was applied, though lactic acid content of blood is the same in both sugars.

4. pH of urine decreases even when glucosamine chlorhydrate was given after being neutralized.

5. Fructosazine was not detected in urine.

Sincere thanks are due to Professor K. Kodama for criticism and advice; to Dr. M. Mita, Professor of Pediatrics, for encouragement, and particularly to Assistant Professor H. Masamune for kind direction and continuous encouragement throughout this work.

#### REFERENCES.

- Baumgarten, O. (1906): *Zeitschr. f. exp. Path. u. Therapie*, **2**, 64.  
 Benedict, R. (1911): *J. Am. Med. Ass.* **57**.  
 Cathcart, P. (1903): *Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **27**, 167.  
 Fabian, E. (1899): *Hoppe-Seyler's Zeitsch. f. physiol. Chem.*, **39**, 423.  
 Forstbach, T. (1906): *Beiträge zur chem. Physiologie u. Pathologie*, **8**, 313.  
 Fujii, J. (1924): *Tohoku Jour. of exp. Med.*, **5**, 405.  
 Griffith, W. H. (1931): cited in *B. ü. die ges. Physiologie u. exp. Pharmakologie*, **60**, 754.  
 Iwasaki, K. and M. Mori: K. Sudo's *Shoikagakujishhu* (1929) published by Uryu Saiseikan, Tokyo, 15th edition 234.  
 Kueny (1890): *Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. phys. Chem.*, **14**, 330.  
 Kawabe, K. (1934. i): *J. of Biochemistry*, **19**, 319.  
 Kawabe, K. (1934. ii): *J. of Biochemistry*, **20**, 233.  
 Kawabe, K. (1934. iii): *J. of Biochemistry*, **20**, 243.  
 Kasai, Y. and Nakamura, K. (1926): *Osaka Igakkai Zasshi*, **26**, 1.

- Knop-Hüfner: cited by K. Sudo's Shoikagakujissu (1929) publ. by Uryu Saiseikkan, Tokyo, 15th edition, 263.
- Moschini, A. (1925): cited in Ber. ü. die ges. Physiologie u. exp. Pharmakologie, **31**, 69.
- Meyer, K. (1907): Beiträge zur. chem. Physiol. u. Pathol., **9**, 134.
- Masai, Y. (1918): Mitteilungen d. med. Gesellschaft zu Osaka, **17**, 1.
- Stolte, K. (1908): Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol., **11**, 19.
- Sato, K. (1923): Tohoku Journal of exp. Med., **4**, 321.
- Sato, S. (1931): Keio Igakkai Zasshi, **12**, 325.
- K. Sudo: Ikagakuteki Biryosokuteiho (1931): published by Uryu Saiseikan, Tokyo, 1st edition, 218.
- Tanaka, S. and M. Endo: K. Sudo's Shoikogakujisshu (1929) publ. by Uryu Saiseikan, Tokyo, 15th edition, 277.



## BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

### XI. On the Constitution of Benzoylglucuronic Acid and the Enzyme which Hydrolyses this Compound.

By

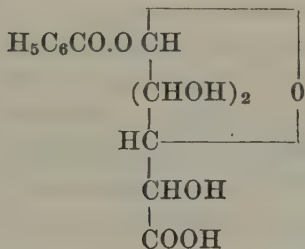
HAJIME MASAMUNE.

(From the Medico-chemical Institute, Kyushu Imperial University, Fukuoka.

Director: Professor K. Kodama.)

(Received for publication, May 7, 1934)

Magnus-Levy (1907) who first isolated benzoylglucuronic acid as sodium and strychnine salts assigned to it the formula



But subsequently Quick (1926) proposed that it is 2-benzoylglucuronic acid, basing his theory on its optical behaviour in the slightly alkaline solution or in the presence of NaCN, which was ascribed to the preexisting free aldehyde radicle. Quick gave no analytical data on the behaviour of benzoyl radicle.

The latter assumption was, however, opposed again by Pryde and Williams (1933, ii) from various considerations and especially because of the fact that cyanhydrin formation of it is accompanied by the fission of free benzoic acid which was isolated by them. They assumed that the aldehyde group is combined with the benzoyl radicle so that cyanhydrin is formed only when it is set free. But the experimental evidence for this assertion seems insufficient, because these two chemical processes have not necessarily causal relation; namely the benzoyl remainder may be split off readily by the alkalinity of cyanide, even when it is combined with a carbon atom other than C<sub>1</sub>.

It is a matter of importance, therefore, to examine whether or not the benzoyl group is actually set free in the experiment of Quick with  $\text{NaHCO}_3$  or  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . The writer's experiment revealed that mutarotation occurred but no hydrolysis was detected at all and thus supported Quick's postulation. Judging from the pyranoid structure of glucuronic acid which was established by Pryde and Williams (1933,i), the benzoyl group is rather attached to either  $\text{C}_2$  or  $\text{C}_4$ .

The enzymic fission of benzoylglucuronic acid takes place when it is incubated with chloroform water extract of a certain animal tissue. The enzyme in the extract was destroyed by heating for ten minutes at  $80^\circ\text{C}$ , and the optimal pH was found to lie between 5.8 and 5.4.

Since benzoic acid is conjugated with glucuronic acid by means of an ester link, the enzyme is possibly identical with the ordinary esterase. But the activity of decomposing tributyrin did not always run parallel with that of hydrolysing benzoylglucuronic acid in several enzyme specimens. The writer denominates it provisionally "glucuronidase," leaving details of the specificity of the enzyme to a future investigation.

#### EXPERIMENTAL.

##### *Preparation of benzoylglucuronic acid.*

The crude product obtained by the Quick method was got rid of impurities by extraction with chloroform and with ether, dissolved in hot water (50 gm. in 750 cc.), decolorized with Nörit and cooled in the air. Thereupon, as the still contaminating hippuric acid came out, it was removed on the filter; the mother liquid was placed in the ice chest over night, and benzoylglucuronic acid which precipitated out in thin needles was collected on a Büchner funnel. The last procedures were repeated until no hippuric acid remained and crystals were dried in vacuo over  $\text{P}_2\text{O}_5$ . F.P.  $182^\circ\text{C}$ .(uncor.)

##### *The change in rotation of benzoylglucuronic acid caused by splitting off of the benzoyl group.*

0.4 gm. of benzoylglucuronic acid was dissolved in 100 cc. of

0.1 n.  $\text{NaHCO}_3$ , and, after being bubbled with air, the change in optical rotation and the behaviour of benzoyl group were followed at  $5^\circ\text{C}$ . The latter was observed by analysis of free benzoic acid as follows:

30 cc. of the solution were acidified with 1.7 cc. of 2 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and extracted with three 20 cc. portions of toluene, when evolution of  $\text{CO}_2$  gas had ceased. The extracts combined were washed with 15 cc. of saturated sodium chloride solution which was slightly acidified with  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , filtered through a dry filter and titrated with 0.05 n sodium alcoholate, using phenolphthalein as an indicator. The blank experiment was carried out by acidifying 30 cc. of 0.1 n  $\text{NaHCO}_3$  solution with 2.1 cc. of 2 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , followed by the above procedures.

The results are given in table I.

TABLE I.

Time interval min.	$[\alpha]_D^{25}$	pH	Free benzoic acid
30	$-25.0^\circ$	8.6	0
60	$-17.5^\circ$		0
120	$-10.0$		
180	$-2.5^\circ$		
300	0		
1440	$+32.5^\circ$	8.6	0

The benzoyl group was not split off at all, but a marked change of rotation was observed as Quick informed us. The aldehyde group of the conjugated acid is therefore to be regarded as present in a free state.

*Experiments on the benzoylglucuronic acid  
decomposing enzyme.*

1) *Optimal pH.*

The enzymic hydrolysis of the acid was demonstrated by analysis of the freed benzoic acid. The enzyme solution can be obtained in several ways, such as digestion of tissue suspension

with toluene or extraction with chloroform water.

A typical example of determination of optimal pH is given in table II. In this case, the tissue pulp of an ox kidney was ground with sea sand, shaken with double weights of chloroform water for 15 min. and centrifuged. 5 cc. of the supernatant liquor was then mixed in a stoppered tube with 10 cc. of buffer solution and 15 cc. of 0.02 mol. benzoylglucuronic acid and incubated at 37°C, after addition of one drop toluene. After the lapse of 16 hours it was deproteinized, according to the principle of Quick (1932), with 10 cc. of  $2/3$  n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and ten cc. of 10% sodium tungstate, and 40 cc. of the filtrate were treated further as described by the author mentioned. The titration was conducted with 0.05 n  $\text{NaOC}_2\text{H}_5$ .

Parallel experiments were carried out, by replacing in one series benzoyl glucuronic acid solution with water and by boiling in the other as a blank experiment the enzyme extract in advance. In the former case, no acid was extracted into toluene. Corrections were made according to the latter. Buffer solutions (citrate) employed were made as Walbum described but doubling the concentration and applying NaOH solutions, which were more concentrated by 5%. pH was determined by the indicator method (Clark and Lubs.) The optimal pH lies between 5.8 and 5.4.

TABLE II.

pH of the incubation mixture		Composition of buffer solution		Total benzoic acid set free mgm
Before incubation	After incubation	Citrate stock solution cc.	0.21 n NaOH solution cc.	
7.6	6.3	5.25	4.75	21.2
7.1	6.0	5.4	4.6	23.2
6.3	5.8	5.75	4.25	23.6
5.8	5.4	6.5	3.5	24.7
5.0	4.8	10	0	19.9

## 2) Heat inactivation.

Chloroform water extract from an ox kidney obtained by the

procedures described was shaken with kieselguhr (1.5 gm. to 10 cc.) and the supernatant liquor after centrifugation was used for experiment. The experimental procedures are the same as above, except that the enzyme extract was heated at various temperatures for ten minutes and quickly cooled before mixing with the other solutions. The hydrogen ion concentration was controlled between the limits of optimal pH. The enzyme solution was tested herewith for the decomposition of tributyrin by measuring the surface tension according to the ring method at the room temperature. The mixture consisting of 1 cc. enzyme solution, 1 cc. of 2 n ammonium salt buffer (1 part of 2 n  $\text{NH}_3$  + 8 parts of 2 n  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . pH: 8.9) and 20 cc. of saturated tributyrin solution was applied for this purpose and the measurements were taken immediately on preparing and after 1 hour digestion at 37°C. The control experiment was made by replacing the tributyrin solution with water the blank by boiling the enzyme solution in advance. The circumference of the ring was 0.914 cm. Table III indicates that the enzyme in question is destroyed by heating at 80°C for ten minutes. The activity of decomposing tributyrin disappeared also at this temperature.

TABLE III.

	not heated	Heated at				
		50°	60°	70°	80°	90°C
Total benzoic acid set free (mgm)	20.7	20.7	3.8	0.6	0	0
Tributyrin decomposition	complete	complete	incomplete	incomplete	0	0

3) *Comparison of the activity of hydrolysing benzoyl-glucuronic acid with that of decomposing tributyrin in various enzyme specimens.*

Specimen No. 1. The enzyme extract prepared from an ox kidney as described in 2) was stirred with 3 volumes of alcohol (95%) and centrifuged without delay. The centrifugate was suspended in water of 0.67 volume of the original enzyme extract



kept in the ice chest for 24 hours, and the liquid was separated by centrifugalization and let act on benzoylglucuronic acid and tributyrin as noted but using the fivefold diluted extract in the test with the latter. 10.9 mgm of benzoic acid were set free from  $3 \times 10^{-4}$  mol of benzoylglucuronic acid, but tributyrin was not decomposed at all.

Specimen No. 2. 320 gm. of tissue pulp of an ox kidney was submitted to autolysis with 640 cc. of 0.85% NaCl solution and 50 cc. of toluene at 37°C for three days. The mixture was then centrifuged and the supernatant liquid centrifuged again after treatment with kieselguhr (1.4 gm. to 10 cc.). The liquor thus obtained was determined on the enzymic activities exactly the same way as specimen No. 1 was. Here the decomposition of tributyrin was proved definitely, but that of benzoylglucuronic acid was found to be relatively less. (2.9 mgm) (Table IV.)

TABLE IV.  
Room temperature 21°C.  
Circumference of the ring 0.914 cm

	Surface tension $\frac{\text{dyne}}{\text{cm}}$	
	Directly on mixing	After 1h. incubation at 37°C
Main exp.	59.7	57.2
Control exp.	63.6	63.6
Blank exp.	59.7	59.7

Specimen No. 3: Blood serum of a rabbit was diluted five times with water. Contrary to specimen No. 1, the amount of the free acid was but trace (1.6 mgm) whereas tributyrin was perfectly hydrolysed even when incubated for 15 minutes.

TABLE V.  
Room temperature 20°C.  
Circumference of the ring 0.914 cm

	Surface tension $\frac{\text{dyne}}{\text{cm}}$	
	Immediately on mixing	After 15 min. incubation at 37°C
Main exp.	50.7	62.0
Control exp.	62.0	62.0
Blank exp.	50.7	50.7

These results are suggestive of the individuality of both enzymes.

Thanks are due to Professor K. Kodama for criticisms.

#### REFERENCES.

- Magnus-Levy, A. (1907): *Bioch. Z.*, **6**, 503.  
 Pryde, J. and Williams, R. T. (1933, i): *Bioch. J.*, **27**, 1197.  
 " " (1933, ii): *Bioch. J.*, **27**, 1210.  
 Quick, A. J. (1926): *J. of Biol. Chem.* **69**, 549.  
 Quick, A. J. (1932): *J. Biol. Chem.* **96**, 75.



## DIE BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL. (XXXII)

### Glykogenbildung der Leber und das $P_H$ des Harns von hungernden Kaninchen unter Einfluss von Gallensäure.

VON

KANAME OHASHI.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 11. Mai, 1934)

Es ist bekannt, dass die Reaktion des Harns wesentlich von der Beschaffenheit der Nahrung abhängt und die Fleischfresser in der Regel einen sauren, die Pflanzenfresser einen neutralen oder alkalischen Harn absondern, während umgekehrt der Pflanzenfresser beim Hungern einen sauer reagierenden Harn absondern kann, wenn er auf Kosten seiner eigenen Fleischmasse lebt.

Bei dem letzten Fall muss also das  $P_H$  des Harns herabgesetzt werden. Nun wird nach Kuramoto (1934) das  $P_H$  des Harns und nach Itoo (1930) das der Galle aus der Leber durch Zufuhr von Cholsäure gesteigert, wobei die Reaktion des Harns u. der Galle alkalisch wird.

Nach Thannhauser (1929) wirkt die Nucleinsäure im Organismus als feinsten Puffer, deren Stoffwechsel durch Gallensäure gefördert wird, wie Karasawa (1926), Okamura (1930) u. Tanaka (1933) in ihrem Versuch bewiesen haben.

Nach Thannhauser (1929) soll die Nucleinsäure je nach Bedarf nach der sauren oder alkalischen Seite hin verändert werden können, da ihrer Konstitution nach eine basische und eine saure Komponente vorhanden ist.

Was das  $P_H$  des Harns im Hungerzustand betrifft, so wurde von Beckmann (1922) gefunden, dass das  $P_H$  des Kaninchenharns nach 1–2 tägigem Hunger 5,91 beträgt, während das des

Menschenharns nach Hasselbalch (1912) im Laufe von 1-2 tägigem Hunger mit 4,94-4,78 gezeigt wird, und nach Freund (1901) nach 6-10 tägigem Hunger der anfangs saure Harn wieder zur Norm gebracht oder seine Acidität herabgesetzt wird.

Die Acidität des Harns im Hungerzustand ist je nach dem beim Menschen und dem Tiere ganz verschieden.

Es ist bekannt, dass das Körpereiwiss durch Hunger zersetzt und die Leber von Glykogen fast frei wird, welches jedoch im Hunger aus den zersetzten Eiweissbausteinen gebildet, in der Leber nachweisbar ist.

In obigem Sinne habe ich den Einfluss der Cholsäure auf das PH des Harns und auf die Glykogenbildung der Leber von Kaninchen bei viele Tage dauerndem Hunger, während dessen das Nuclein des Zellkerns im Zerfall ist, untersucht, einerseits um den Mechanismus der Gallensäurewirkung auf die Wasserstoffionenkonzentration des Körpersaftes im Hunger, und andererseits um das Wesen der die Glykogenie der Leber im Hungerzustand fördernden Wirkung der Gallensäure klarzustellen.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Kräftige männliche Kaninchen wurden 6 oder 10 Tage lang im Hunger gehalten, und vor u. nach dem Hunger wurde das PH des katheterisierten Harns nach Itano (1929/30) bestimmt. Dann wurden die Tiere unter Nackenschlag und Verblutung getötet, und der Glykogengehalt der schnell herausgeholt und abgewogenen Leber wurde nach Iwasaki u. Moori (1926) u. Bertrand bestimmt.

In einem anderen Falle wurde den 6 oder 10 Tage lang hungernden Kaninchen 3ccm einer 1%igen Natriumcholatlösung subcutan verabreicht und vor dem Hunger und 3 Stunden nach der Cholatzufuhr das PH des Harns ebenfalls bestimmt. Nach dem Ablassen des Harns wurde der Glykogengehalt der Leber in der gleichen Weise festgestellt.

In einem weiteren anderen Falle wurde das Kaninchen mehrere Tage im Hunger gehalten und jeden Tag zu bestimmter Zeit das PH des Harns in der gleichen Weise bestimmt.



Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I-V zusammengestellt.

### 1. *Der P<sub>H</sub>-Wert des Harns im Hunger.*

Aus der Tabelle I erhellt, dass der P<sub>H</sub>-Wert des Harns vom ersten oder zweiten Tage des Hungers an mit der Zeit allmählich herabgesetzt wird, wobei der Anfangswert des P<sub>H</sub> des Harns 8,522–7,261 im Laufe von 6–14 Tagen allmählich bis zum Wert 4,657–5,541 heruntergeht. Es ist bekannt, dass der Harn von Pflanzenfressern gegen Lakmus alkalisch reagiert. Nach langer Hungerzeit wird also der alkalische Harn des Kaninchens sauer, und diese Acidität nimmt im Laufe der Hungertage allmählich zu.

Diese durch Hunger saurer gewordene Harnacidität wird vor dem Hungertod wieder abgeschwächt, wie aus den Versuchen 1, 2 u. 3 der Tabelle I ersichtlich ist.

### 2. *Einfluss der Cholsäure auf das P<sub>H</sub> des Harns und den Glykogengehalt der Leber nach 6 Tagen Hunger.*

Aus den Tabellen II u. III ist ersichtlich, dass das P<sub>H</sub> des Harns vor dem Hunger 6,962–8,522 und nach dem Hunger 5,593–4,276 beträgt, während das P<sub>H</sub> vor dem Hunger mit 7,101–8,522 und nach 6 Tagen Hunger bei Zufuhr von Cholsäure mit 6,754–4,224 gezeigt wird.

Der P<sub>H</sub>-Wert des Harns wird also durch Hunger herabgesetzt und dieser herabgesetzte P<sub>H</sub>-Wert durch Zufuhr von Cholsäure im allgemeinen wieder etwas gesteigert.

Die Cholsäure wirkt also auch im Hunger die Reaktion des Harns nach der alkalischen Seite hin verschiebend, wie Kuramoto(1934) bei normalen Hundeharn beobachtet hat. Dies scheint mir auf der den Nucleinstoffwechsel im Hunger fördernden Wirkung der Cholsäure zu beruhen, indem die als Puffer wirkende Nucleinsäure aus Zellen nach der alkalischen Seite hin verändert werden könnte.

Was den Glykogengehalt der Leber im 6 Tage anhaltenden Hunger anbetrifft, so wurde gefunden, dass er 0,613% beträgt, während er bei Zufuhr von Cholsäure mit 0,962% gezeigt wird.



TABELLE II.  
Versuch nach 6 Hungertagen.

Dat.	Nr.	Körpergewicht.		Pn des Harns bei 18°C		Lebergewicht (g)	Leberglykogen	
		vor Hunger (g)	nach Hunger (g)	vor Hunger	nach Hunger		mg	%
26/III	1	1750	1380	7,673	4,276	31,5	97,34	0,309
"	2	1780	1490	8,002	4,883	23,2	279,29	1,204
"	3	1900	1670	7,932	4,328	25,7	114,72	0,446
"	4	2290	1950	6,962	4,709	31,2	220,74	0,708
"	5	2160	1900	7,898	4,883	29,7	156,14	0,526
"	6	1810	1530	7,655	4,917	23,1	57,94	0,251
28/III	7	1830	1585	7,759	—	31,4	78,80	0,251
"	8	2080	1820	8,522	5,593	37,2	39,98	0,107
"	9	2000	1860	7,326	5,055	29,3	309,68	1,057
"	10	2450	2040	8,522	5,004	32,1	243,63	0,759
"	11	1900	1700	8,522	4,709	30,3	331,11	1,093
"	12	1980	1650	8,019	5,333	26,7	172,07	0,644
<b>Durchschnittswert</b>							<b>175,12</b>	<b>0,613</b>

TABELLE III.

Versuch nach 6 Hungertagen bei Zufuhr von Cholsäure.

Dat.	Nr.	Körpergewicht.		PH des Harns bei 18°C		Leber- gewicht (g)	Leberglykogen	
		vor Hunger (g)	nach Hunger (g)	vor Huuger	nach Hunger		mg	%
27/III	1	2200	1650	7,101	4,224	28,1	214,95	0,765
"	2	1980	1605	7,569	5,021	30,2	621,67	2,059
"	3	2020	1660	8,209	4,744	30,0	435,69	1,452
"	4	1750	1400	8,522	4,224	28,3	294,32	1,040
"	5	2200	1970	7,517	5,697	33,9	334,01	0,985
"	6	1980	1480	8,141	4,813	25,9	222,19	0,858
29/III	7	1990	1620	8,106	4,409	33,2	200,46	0,604
"	8	1950	1550	7,673	4,640	28,4	294,32	1,036
"	9	1890	1560	7,881	6,754	80,2	172,07	0,570
"	10	2100	1750	8,244	—	29,3	128,91	0,440
"	11	2380	1980	8,522	4,553	34,9	331,11	0,949
"	12	1980	1700	7,846	5,263	30,0	243,63	0,812
<b>Durchschnittswert</b>							<b>291,11</b>	<b>0,962</b>

Dat.	Nr.	Körpergewicht.		pH des Harns bei 18°C		Leber- gewicht (g)	Leberglykogen	
		vor Hunger (g)	nach Hunger (g)	vor Hunger	nach Hunger		mg	%
13/IV	1	2270	1500	7,033	4,414	27,9	290,27	1,040
"	2	1740	1550	6,939	4,167	21,4	42,87	0,176
"	3	2060	1230	7,766	5,159	26,0	46,54	0,179
"	4	1950	1570	8,452	5,420	27,0	346,18	1,282
"	5	1870	1310	7,784	5,333	21,0	28,68	0,137
14/IV	6	1780	1400	8,383	5,437	26,9	427,58	1,590
"	7	1780	1370	7,927	4,934	32,8	100,23	0,306
"	8	1720	1180	8,522	5,471	26,3	57,83	0,220
"	9	1900	1430	8,522	4,432	23,9	86,01	0,360
"	10	2350	1920	8,522	5,229	26,8	330,82	1,234
"	11	1870	1440	7,603	5,021	29,1	186,27	0,640
Durchschnittswert							176,67	0,651

Die Glykogenbildung der Leber im Hungerzustand wird also durch Zufuhr von Cholsäure durchschnittlich um 56,9% gesteigert, was auf Verwendung eigener Eiweissbausteine beruhen dürfte.

3. *Einfluss der Cholsäure auf das P<sub>H</sub> des Harns und den Glykogengehalt der Leber nach 10 Tagen Hunger.*

Aus den Tabellen IV u. V lässt sich ersehen, dass das P<sub>H</sub> des Harns vor dem Hunger 6,979–8,522 und nach 10 Tagen Hunger 4,328–4,952 beträgt, während es vor dem Hunger mit 6,939–8,522 und nach 10 Tagen Hunger bei Zufuhr von Cholsäure mit 4,414–5,471 gezeigt wird.

Die Reaktion des Harns wird desto saurer, je mehr Tage der Hunger andauert, wobei der P<sub>H</sub>-Wert des Harns nach 10 Tagen Hunger niedriger liegt als nach 6 Tagen Hunger (Vergleiche Tabellen II u. IV).

Der durch 10 Tage Hunger herabgesetzte P<sub>H</sub>-Wert des Harns wird also durch Zufuhr von Cholsäure im allgemeinen wieder etwas gesteigert. Die Cholsäure wirkt auch im 10 tägigen Hunger die Reaktion des Harns nach der alkalischen Seite hin verschiebend.

Diese Verschiebung des P<sub>H</sub>-Wertes des Harns nach der alkalischen Seite hin durch Zufuhr von Cholsäure tritt viel schwächer auf, als es nach Kuramoto (1934) bei normalen Hundeharn der Fall war.

Dies scheint mir auf der durch viele Hungertage erschöpfenden Zersetzung des Körpereiwisses zu beruhen, was eine saurere Reaktion des Körpersaftes zur Folge hat.

Der Glykogengehalt der Leber nach 10 Tagen Hunger beträgt durchschnittlich 0,351% und bei Zufuhr von Cholsäure 0,651%, wie in den Tabellen IV u. V angegeben ist.

Die Glykogenbildung der Leber nach 10 Tagen Hunger tritt viel geringer auf als nach 6 Tagen Hunger und wird durch Zufuhr von Cholsäure durchschnittlich um 85,5% gesteigert. Dass diese Steigerung stärker auftritt als nach 6 Tagen Hunger, dürfte auf der infolge mehrerer ununterbrochener Hungertage einsetzenden, vermehrten Zersetzung des Eiweisses bzw. des Nucleins beruhen, indem dadurch das Baumaterial, bzw. die Aminosäure für die



Glykogenbildung und die als Puffer einwirkende Nucleinsäure vermehrt wird, weil das PH des Harns nach längerem Hunger durch Zufuhr von Cholsäure stärker gesteigert wird als nach kürzerem Hunger, obwohl zwischen den PH-Werten nach 6 u. 10 Tagen Hunger fast kein Unterschied nachweisbar war.

Die die Glykogenie fördernde Wirkung der Cholsäure geht also parallel mit der Steigerung des PH-Wertes im Harn.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Der PH-Wert des Kaninchenharns wird nach viele Tage langem Hunger herabgesetzt, und diese Herabsetzung nimmt allmählich im Laufe der Hungertage zu.

2. Der durch Hunger herabgesetzte PH-Wert wird durch Zufuhr von Cholsäure wieder gesteigert.

3. Die Glykogenbildung der Leber, die nach vielen Hungertagen vermindert ist, wird durch Zufuhr von Cholsäure wieder gesteigert. Diese Steigerung geht fast parallel mit der des PH-Wertes im Harn.

#### LITERATUR.

- Beckmann, K. (1922): Zschr. f. ges. exper. Med., **29**, 579.  
Freund, E. u. Freund, O. (1901): zit. von C. Neuberg, „Der Harn“ 1911 Aufl. Teil I. s. 13.  
Hasselbalch, K. A. (1912): Bioch. Zschr., **46**, 403.  
Ito, T. (1930): Arb. a. d. Med. Univ. Okayama, **2**, 103.  
Itano, A. (1929/30): Ber. d. Ohara Inst., **4**, 19. u. 471.  
Iwasaki, K. u. Moori, M. (1926): Praxis d. Physiol. Chem. Kursus nach Sudo, 11. Aufl. 334.  
Kuramoto, T. (1934): Jl. of Bioch., **19**, 245.  
Karasawa, R. (1926): Jl. of Bioch., **6**, 139.  
Okamura, Takeji (1930): Arb. a. d. Med. Univ. Okayama, **2**, 245.  
Thannhauser, S. J. (1929): Stoffwechsel u. Stoffwechselkrankh. s. 562.  
Tanaka, K. (1933): Jl. of Bioch., **17**, 111.

## ÜBER DEN EINFLUSS DER CHOLERETIKA AUF DIE GEWEBSATMUNG DER LEBER.

VON

HIDEO NAKAGAWA.

*(Aus der II medizinischen Klinik der kaiserlichen Universität zu Sapporo.  
Vorstand: Prof. Dr. S. Nakagawa.)*

(Eingegangen am 8. Juni 1934.)

### I. EINLEITUNG.

Es ist wohl bekannt, dass alle Organe im tierischen Organismus zur Erhaltung ihres Lebens  $O_2$  verbrennen und  $CO_2$  ausscheiden. Diesbezügliche Forschungen richteten sich aber hauptsächlich auf verschiedene Drüsen. In Bezug auf die Gewebsatmung der Niere z.B. haben Barcroft und Brodie (1905–06), Barcroft und Straub (1910) und Tamura und Miwa (1920) genauere Untersuchungen angestellt und die letzteren beiden Forscher kamen zu dem Schluss, dass der  $O_2$ -Verbrauch der Niere sogar während der gesteigerten Harnabsonderung nicht merklich beeinflusst wird, während er nach Barcroft und seinen Mitarbeitern durch die Diurese auffallend zunimmt.

Wenn man nun die Literatur der Gewebsatmung der Leber überblickt, welche die grösste Drüse im Organismus darstellt, so liegen uns zahlreiche Arbeiten vor. Sie ist von verschiedenen Seiten genau untersucht worden. Meyerhof, Lohmann und Meier (1925), Reinwein (1928) und Kisch (1931) haben nämlich den Einfluss der Aminosäuren auf die Gewebsatmung der Leber untersucht, mit dem Resultate, dass sie angeregt wird. Horiuchi (1930–32) hat festgestellt, dass der  $O_2$ -Verbrauch der Leber nach Einnahme von Eiweisssubstanzen auffallend, nach Einnahme von Fett weniger auffallend und nach Einnahme von Kohlehydraten kaum zunimmt. Andererseits haben Mortos und Schneider (1926) und Iwasawa (1927) eine Zunahme des  $O_2$ -Verbrauches der Leber bei Darreichung der Zuckerarten nachgewiesen. Im

Gegensatz zu diesen erhöhenden Einflüssen der verschiedenen Faktoren führen Chloroform- und Äthernarkose (Trincas, Grasheim-1926), Phosphorvergiftung (Grasheim), Phlorhizin-, Uran-, Strychnin-Vergiftung und Blockade des retikuloendothelialen Systems (Kinoshita-1930) Hepatotoxin (Osawa-1930) eine Abnahme der Gewebsatmung der Leber herbei.

Obwohl die Gewebsatmung der Leber, wie erwähnt, von verschiedenen Seiten ausführlich untersucht worden ist, liegt uns, soweit ich die Literatur nachsehen konnte, keine einzige systematische Untersuchung in Bezug auf den Einfluss der Choleretika auf die Gewebsatmung der Leber vor. So habe ich mir auf Veranlassung von Herrn Prof. Nakagawa die Aufgabe gestellt, in diesem Punkte genauen Einblick zu erhalten.

## II. METHODISCHES.

Als Versuchstier diente mir ausschliesslich die weisse Maus. Die Tiere wogen 70–160 g. Ich habe, um den Einfluss der Fütterung auszuschliessen, die Tiere vor dem Versuche wenigstens 5–6 Tage lang mit einem bestimmten Futter ernährt und 12–18 Stunden vor Anstellung der Versuche vollkommen hungern lassen. Um den O<sub>2</sub>-Verbrauch des Leberstückchens, welches ich immer der Randzone des linken Lappens entnommen habe, zu messen, wendete ich den Apparat für Mikrobestimmung nach Warburg an.

## III. KONTROLLVERSUCHE.

Es ist wohl kaum erwähnenswert, dass genaue Kontrollversuche unbedingt notwendig sind, um die Beurteilung der erhaltenen Versuchsergebnisse sicher zu stellen. Ich habe deswegen an einer jeden Gruppe der Versuchstiere, welche ich jedesmal eingekauft habe, genaue Kontrollversuche angestellt. Dabei habe ich ausser der Leber auch die Gewebsatmung der Milz untersucht, mit der Annahme, dass die Milz als Kontrollorgan dienen könnte.

Ich habe während meines ganzen Versuches viermal Tiere eingekauft, deswegen habe ich an vier Gruppen Kontrollversuche angestellt, deren Resultate ich in Tabelle I kurz zusammenstellte. Es stellte sich heraus, dass der durchschnittliche Wert der Gewebs-

atmung an vier Gruppen 5,72–6,45 für Leber, 7,61–7,25 für Milz. ist.

TABELLE I.

Gruppe	Untersuchte Zahl	Qo:			
		Maximum	Minimum	Durchschnitt	
Leber	I	26	7,56	4,56	5,72
	II	9	7,45	5,00	6,45
	III	10	6,71	5,60	6,20
	IV	7	7,39	5,60	6,26
Milz	I	9	8,45	6,93	7,61
	II	6	8,40	7,08	7,52
	III	8	7,94	6,44	7,25
	IV	6	8,19	6,83	7,39

## 2. Atophan.

Seit Brugsch und Horsters (1923–24) die kräftige cholere-tische Wirkung des Atophannatriums angegeben hatten, ist das Mittel als kräftiges Choleretikum von vielen Seiten anerkannt, obwohl Stransky (1925) beim Kaninchen seine choleretische Wirkung nicht nachweisen konnte. In unserem Laboratorium haben Sakamoto (1932), Imuro (1933) und Kubo (1934) eine intensive Cholerese nach Atophanylinjektion an Gallenblasen fistel-hunden tadellos bewiesen. Und zwar soll nach Sakamoto die Gallen-sekretion innerhalb 30 Minuten nach intravenöser Atophanyl-injektion ihr Maximum erreichen, um darnach allmählich abzu-steigen.

Zum Zwecke, die Beziehungen zwischen der Gewebsatmung der Leber und der Atophan-Cholerese zu erkennen, habe ich zuerst das Atophannatrium in Form von Atophanyl der Aufschwem-mungsflüssigkeit des Leberstückchens direkt zugesetzt. Die Kon-zentrationen des Atophannatriums betrugen dabei 1–500 mg%.

Die erhaltenen Resultate zeigen uns deutlich, wie aus Tabelle II ersichtlich, dass der Atophanzusatz die Gewebsatmung der Leber

in auffallendem Masse hemmt, und zwar wird die letztere desto hochgradiger gehemmt, je konzentrierter das Atophan ist. Sogar in einer 1 mg% Lösung des Atophannatriums konnte ich noch einen hemmenden Einfluss beobachten.

Was die Einwirkung der intravenösen Atophanylinjektion anbelangt, so habe ich das Mittel in einer Dosis von 2,5 mg des Atophannatriums den 70–90 g schweren weissen Mäusen intravenös dargereicht und nach 15, 30 und 60 Minuten den O<sub>2</sub>-Verbrauch der Leber untersucht.

TABELLE II

Nr.	Kg. (g)	Atophanyl (mg%)	Leber (Qo.)	Durchschnitt	Ab-oder Zunahme
1	70	500	1,53	1,22	– 78,6%
2	70	„	1,49		
3	75	„	1,07		
4	70	„	0,81		
1	70	100	2,55	2,69	– 52,9%
2	75	100	2,51		
3	75	„	2,66		
4	70	„	3,03		
1	70	50	3,14	3,37	– 41,0%
2	70	„	3,27		
3	75	„	4,08		
4	75	„	3,61		
1	65	5	5,54	5,25	– 8,2%
2	70	„	4,96		
1	75	1	5,20	5,32	– 6,9%
2	70	„	5,44		
Kontrolle				5,72	

Bei dieser Versuchsbedingung konnte ich, wie aus der beige-fügten Tabelle III ersichtlich, im Gegensatz zu den obigen Versuchen, einen auffallend gesteigerten O<sub>2</sub>-Verbrauch der Leber feststellen. Er ist im Vergleiche mit den Kontrollen höher um



21,5% nach 15, um 8,8% nach 30 und nur um 4,8% nach 60 Minuten nach der Injektion. Die Milz verbraucht dagegen O<sub>2</sub> nicht mehr als die Kontrolle 15 Minuten nach der Injektion, nach 30 Minuten sogar um 4,5% weniger.

TABELLE III.

(Intravenöse Injektion von 2,5 mg Atophannatrium im Form von Atophanyl.)

Nr.	Zeit nach Injektion	Leber Qo <sub>2</sub>	Durchschnitt	%	Milz Qo <sub>2</sub>	Durchschnitt	%
1	15	9,01	7,84	+31,5	8,40	7,55	+0
2	"	6,53			6,01		
3	2	9,90			9,90		
4	"	5,60			7,01		
5	"	7,73			7,05		
6	"	8,26			6,63		
1	30	8,00	7,02	+8,8	7,60	7,18	-4,5
2	"	7,00					
3	"	6,97			6,22		
4	"	6,84			7,23		
5	"	6,24			7,35		
6	"	7,08			7,52		
1	60	6,40	6,76	+4,8			
2	"	6,88					
3	"	6,34					
4	"	7,43					
Kontrolle			6,45			7,52	

In diesen Versuchen habe ich, wie erwähnt, das Atophanyl angewandt, welches neben dem Atophannatrium salizylsaures Natrium enthält. So war ich genötigt, die etwaige Wirkung des salizylsauren Natriums selbst zu untersuchen, um aus den Atophanylversuchen auf die eigentliche Wirkung des Atophannatriums zu schliessen. Die dahingelerichteten Untersuchungen haben mir aber klar gestellt, dass das salizylsaure Natrium in einer Menge, wie sie im Atophanyl enthalten ist, keinen auffallenden Einfluss

auf den  $O_2$ -Verbrauch der Leber auszuüben imstande ist.

Kurz gefasst, das Atophannatrium hemmt beim direkten Zusatz zu der Ringerlösung den  $O_2$ -Verbrauch der Leber, aber befördert ihn auffallend bei der intravenösen Injektion desselben; in diesem letzteren Falle ist zu beachten, dass der gesteigerte  $O_2$ -Verbrauch der Leber schon 15 Minuten nach der Injektion sein Maximum erreicht. Dieser zeitliche Ablauf ist identisch mit dem der gesteigerten Atophan-Choleresse, welche in unserem Laboratorium von Sakamoto festgestellt worden ist. Die Milz wird dabei kaum beeinflusst.

### 3. Gallensäure.

Es ist wohl bekannt, dass die Gallensäure eine der kräftigsten Choleretika im Sinne von Brugsch ist. In unserem Laboratorium hat Sakamoto (1930) den zeitlichen Ablauf der Gallensäure-Choleresse und den Einfluss derselben auf die Gallenbestandteile sehr genau untersucht. Nach ihm soll die Gallensäure-Choleresse innerhalb 30 Minuten schon ihr Maximum erreichen, um in den weiteren 30 Minuten wieder abzusinken.

Ich habe zuerst den Einfluss der Gallensäure auf die Gewebsatmung der Leber beim direkten Zusatz derselben zur Ringerlösung untersucht. Zu diesem Zwecke wurde der Ringerlösung cholsaures Natrium in einer Konzentration von 1–100 mg% hinzugesetzt. Die dabei erhaltenen Resultate zeigen uns, (Tabelle IV) dass diese Gallensäure sich in einer Konzentration von 100 mg% um 18%, in einer 50 mg% Lösung um 7,8%, und in einer 10 mg% Lösung um 2,8% den  $O_2$ -Verbrauch des ausgeschnittenen Leberstückchens hemmt, während sie ihn in einer 1 mg% Lösung um 6,8% erhöht.

Nun habe ich weiter den Einfluss der intravenösen Injektionen der Gallensäure auf Leber und Milz erforscht.

Zuerst wurde der  $O_2$ -Verbrauch der Leber und Milz 15 Minuten nach den intravenösen Injektionen der verschiedenen grossen Dosen cholsauren Natriums untersucht, um das quantitative Verhältnis des zu injizierenden Mittels zu bestimmen. Die dabei erhaltenen Resultate zeigten uns klar, dass cholsaures

TABELLE IV.

Nr.	Cholsaures Na. (mg%)	Qo. der Leber	Durchschnitt	Ab- oder Zunahme
1	100	3,71	4,69	-1,8%
2	"	5,35		
3	"	4,92		
4	"	3,36		
5	"	5,19		
6	"	5,58		
1	50	4,63	5,27	-7,8%
2	"	5,75		
3	"	5,57		
4	"	5,39		
5	"	5,01		
1	10	5,69	5,56	-2,8%
2	"	5,73		
3	"	5,25		
1	1	6,93	6,11	+6,8%
2	"	5,60		
3	"	6,01		
4	"	5,92		
Kontrolle			5,72	

TABELLE V.

Nr.	Zeit n Injektion	Cholsaures Na.	Qo. d. Leber	Durchschnitt	Ab- oder Zunahme
1	15 Min.	10	6,85	7,83	+ 36,9%
2		"	7,46		
3		"	7,13		
4		"	8,80		
5		"	8,79		
6		"	7,96		
1	15 Min.	5	7,15	7,65	+ 33,7%
2		"	7,51		
3		"	7,96		
4		"	7,70		
5		"	7,93		
1	15 Min.	1	6,33	6,31	+ 10,3%
2		"	5,81		
3		"	5,96		
4		"	7,09		
5		"	6,34		
Kontrolle				5,72	

Natrium in einer Menge von 10 mg den O<sub>2</sub>-Verbrauch der Leber um 36,9%, und in einer Menge von 5 mg um 33,7% erhöht, während es ihn bei Injektion von 1 mg bloss um 10,3% in die Höhe treibt.

Wenn man nun an Stelle des cholsauren Natriums das weniger giftige dehydrocholsaure Natrium intravenös einverleibt, so stellte sich heraus, dass der O<sub>2</sub>-Verbrauch der Leber 15 Minuten nach den Injektionen von 50,10, 5 und 1 mg resp. um 27,6, 34,2, 25,7 und 4,5% mehr betrug als die Kontrolle. Im Gegensatz dazu wurde die Gewebsatmung der Milz bei denselben Mengen kaum beeinflusst (Tabelle VI).

TABELLE VI.

(Die Bestimmungen wurden 15 Min. n. Injekt. ausgeführt.)

Nr.	Dehydrochol. Na	Qo <sub>2</sub> d. Leber	Durchschnitt	Ab- od- Zunahme	Qo <sub>2</sub> d. Milz	Durchschnitt	Ab- od- Zunahme
1	50 mg	7,47	7,30	+27,6%	7,28	7,23	—5,0%
2		7,12			—		
3		7,02			6,73		
4		7,54			7,46		
5		7,46			7,46		
1	10 mg	8,46	7,68	+34,2%	8,08	7,40	—2,7%
2		6,77			7,18		
3		8,18			6,95		
4		7,31			—		
1	5 mg	6,51	7,19	+25,7%	8,03	7,86	+3,2%
2		7,28			7,49		
3		7,39			8,06		
4		7,60			—		
1	1 mg	6,59	5,98	+4,5%	8,01	7,72	+1,4%
2		6,22			8,08		
3		5,85			7,08		
4		5,25			8,00		
Kontrolle			5,72			7,61	

Aus diesen Versuchsergebnissen trat klar zu Tage, dass Natrium cholicum in einer Menge von 5–10 mg, und Natrium

dehydrocholicum in einer Mengen von 10 mg den O<sub>2</sub>-Verbrauch der Leber aufs deutlichste erhöht.

Nun habe ich beabsichtigt, den zeitlichen Ablauf des beeinflussten O<sub>2</sub>-Verbrauchs der Leber und Milz zu untersuchen, indem ich 10 mg von dehydrocholsaurem Natrium intravenös verabreichte.

TABELLE VII.  
(Na dehydrocholicum 10 mg intrav. injiziert.)

Nr.	Zeit n. Injekt.	Qo: d. Leber	Durch- schnitt	Ab- od. Zunahme	Qo: d. Milz	Durch- schnitt	Ab- od- Zunahme
1	30 Min.	8,15	8,19	+ 26,9%	7,93	7,54	0%
2		9,18			8,61		
3		8,01			6,48		
4		8,40			8,06		
5		6,89			7,42		
6		8,52			6,75		
1	60 Min.	8,82	7,79	+ 20,7%	7,07	7,89	+ 4,9%
2		7,40			8,58		
3		8,62			6,81		
4		6,53			9,12		
5		7,61					
1	120 Min.	6,99	7,05	+ 9,0%	6,44	7,65	+ 1,7%
2		6,61			7,89		
3		6,89			7,28		
4		7,08			7,12		
5		6,84			8,65		
6		7,13			7,66		
7		7,84			8,52		
Kontrolle			6,45			7,52	

Die beigefügte Tabelle VII zeigt uns, dass der O<sub>2</sub>-Verbrauch der Leber nach 15 Minuten um 26,9, nach 60 Minuten um 20,7 und nach 120 Minuten nur um 9% höher ist, während er bei der Milz kaum beeinflusst wird.

Es hat sich also klar herausgestellt, dass die Gallensäure bei intravenöser Injektion den O<sub>2</sub>-Verbrauch der Leber auffallend erhöht, während die Atmung der Milz kaum beeinflusst wird. Es



ist hier auch noch zu erwähnen, dass der  $O_2$ -Verbrauch der Leber schon nach 30 Minuten sein Maximum erreicht, was mit dem zeitlichen Ablauf der Gallensäure-Choleresse gut zusammenfällt.

#### 4. *Diuretika (Euphyllin, Salyrgan und Novasurol).*

Einige Diuretika besitzen ausser diuretischer Wirkung auch eine choleretische. In Bezug auf diesen Punkt hat Kubo (1934) in unserem Laboratorium genaue Untersuchungen angestellt und bewiesen, dass Euphyllin und Salyrgan die Gallensekretion deutlich anregen, während dem Novasurol diese choleretische Wirkung vollkommen fehlt. Deswegen habe ich mir die Aufgabe gestellt, zu untersuchen, wie diese Diuretika den  $O_2$ -Verbrauch der Leber beeinflussen. Die erhaltenen Resultate habe ich, um Raum zu sparen, in einer Tabelle VIII kurz zusammengestellt.

Zuerst habe ich den weissen Mäusen 0,02 ccm von Euphyllin intravenös verabfolgt und den  $O_2$ -Verbrauch der Leber und Milz bestimmt. In diesem Falle nimmt er, wenn auch nicht so deutlich wie bei Atophan und Gallensäure, doch merklich zu, und zwar erreicht er das Maximum erst 30 Minuten nach Injektion, um nach 60 Minuten schon zur Norm zurückzukehren. Die Milz wird dagegen von Euphyllininjektion kaum beeinflusst.

Wenn ich aber die doppelte Menge von Euphyllin (0,04 ccm) intravenös injizierte, so konnte ich den erhöhten  $O_2$ -Verbrauch der Leber noch deutlicher konstatieren. Er nimmt 30 Minuten nach Injektion um 21,7% zu, um nach 60 Minuten noch auf einem hohen Wert (19,6%) zu bleiben. Die Milz wird auch in diesem Falle kaum beeinflusst.

Nächst dem wurde auf den Einfluss des Salyrgans hin untersucht. Wenn man Salyrgan 0,025 ccm intravenös injizierte, so stieg der  $O_2$ -Verbrauch der Leber merklich auf, und zwar erreichte er das Maximum 60 Minuten nach Injektion, um nach 120 Minuten noch auf einem hohen Wert zu bleiben. Die Milz wurde kaum beeinflusst.

Wenn man aber die Wirkung des Novasurols untersuchte, so konnte man im Gegensatz zu Salyrgan keinen gesteigerten  $O_2$ -Verbrauch der Leber und Milz konstatieren.

TABELLE VIII.

Mittel intrav.	Zeit n. Injekt.	Leber		Milz	
		Qo <sub>2</sub> (Durchschnitt)	%	Qo <sub>2</sub> (Durchschnitt)	%
Euphyllin 0,02 cem	15 M.	6,69	+ 3,7%	7,42	- 1 %
	30 M.	6,96	+ 7,9%	7,33	- 2,5%
	60 M.	6,57	+ 1,8%	7,30	- 2,9%
	Kontrolle	6,45		7,52	
Euphyllin 0,04 cem	15 M.	6,74	+ 8,7%	7,54	+ 4,0%
	30 M.	7,55	+ 21,7%	7,36	+ 1,5%
	60 M.	7,42	+ 19,6%	7,53	+ 4,0%
	Kontrolle	6,42		7,25	
Salyrgan 0,025 cem	15 M.	6,35	+ 2,3%	7,39	+ 1,9%
	30 M.	6,52	+ 5,1%	7,48	+ 3,1%
	60 M.	7,20	+ 15,4%	7,45	+ 2,7%
	120 M.	7,00	+ 12,9%	7,54	+ 4,0%
	Kontrolle	6,20		7,25	
Novasurol 0,025 cem	20 M.	6,19	- 1,1%	7,56	+ 2,3%
	60 M.	6,20	- 1,0%	7,19	- 2,7%
	120 M.	6,34	+ 1,2%	7,34	- 0,6%
	Kontrolle	6,26		7,39	

Kurz gefasst, solche Diuretika, welche die choleretische Wirkung in sich bergen, wirken auf den O<sub>2</sub>-Verbrauch der Leber merklich erhöhend ein, während solche, welche auf Cholerese nicht einwirken können, keinen Einfluss auf den letzteren ausüben können.

##### 5. Narkotika (*Avertin und Chloralhydrat*).

Was die Literatur über die Beziehungen zwischen Narkotika und Gewebsatmung der Leber anbelangt, so hat Trincas an weissen Mäusen bei Chloroform- oder Äther-Narkose eine herabgesetzte Gewebsatmung des Hirns, der Leber und der Niere konstatiert. Grasheim hat diesen Befund an Leber und Niere völlig bestätigt. Die Versuche von Hayashi und Inada (1932) sind aber zu dem Schlusse gelangt, dass die Gewebsatmung der Leber

und Niere von Kaninchen bei der Darreichung kleinerer Menge von Chloroform zunimmt, bei grösserer Gabe davon dagegen betreffs der Leber abnimmt, während die der Niere auffallend zunimmt. Andererseits ist die Gallensekretion bei Darreichung von Narkotika vielfach untersucht worden. In Bezug auf Gallensekretion bei Darreichung von Avertin und Chloralhydrat, welche bei meinen Versuchen in Betracht kommen, haben Dubois und Fleig, und Stransky (1929) eine kräftige choleretische Wirkung nachgewiesen. Aber der Einfluss dieser Mittel auf die Cholerese und insbesondere auf die Gallenbestandteile ist in unserem Laboratorium zuerst von Kobayashi (1933) tadellos bewiesen. Trotz dieser Untersuchungen liegt keine einzige Angabe vor, die sich auf den Einfluss dieser Mittel auf die Gewebsatmung der Leber bezieht. Meine dahingerichteten Versuche haben zu den Resultaten geführt, welche ich in Tabelle IX kurz zusammenstellte.

Avertin, in einer Menge von 0,3 g pro kg ins Rektum einverleibt, übt auf die Gewebsatmung der Leber nach 5 bis 30 Minuten noch keinen merklichen Einfluss aus, während es nach 60 oder 120 Minuten den O<sub>2</sub>-Verbrauch desselben Organes auf das deutlichste herabsetzte. Die Gewebsatmung der Milz wird dagegen von Anfang der Experimente an bis zum Ende immer herabsetzend beeinflusst.

TABELLE IX.

Mittel ins Rektum	Zeit n. Einverl.	Leber		Milz	
		Qo. (Durchschnitt)	%	Qo. (Durchschnitt)	%
Avertin	5 M.	6,45		7,05	
	15 M.	6,19	+ 3,0%	6,59	- 4,6%
0,3 g	30 M.	6,28	- 1,0%	6,79	- 10,5%
	60 M.	5,03	0 %	6,03	- 8,1%
pro Kg	120 M.	4,22	19,1%	6,68	- 18,4%
	Kontrolle	6,26	- 16,6%	7,39	- 9,6%
Chloralh. 0,5 g pro Kg	15 M.	5,83		6,84	
	30 M.	5,63	- 6,8%	6,44	- 7,4%
	60 M.	5,73	- 10,0%	6,11	- 12,8%
	Kontrolle	6,26	- 8,4%	7,39	- 17,3%

Wenn man ferner Chloralhydrat in einer Menge von 0,5 g pro kg ins Rektum einverleibte, so konnte man nachweisen, dass die Gewebsatmung sowohl der Leber als auch der Milz von Anfang an erheblich heruntergedrückt wurde. Aber der Grad der Herabsetzung war bei der Leber etwas geringer als bei der Milz.

Kurz zusammengefasst, die Narkotika, wie Avertin und Chloralhydrat, wirken auf den  $O_2$ -Verbrauch der Leber und der Milz trotz ihrer kräftigen choleretischen Wirkung herabsetzend ein.

#### IV. DISKUSSION.

Wenn ich meine erhaltenen Resultate zusammenfasse, und kristisch betrachte, so stellt sich klar heraus, dass der direkte Zusatz des Atophayls zur Ringerlösung in einer Konzentration von 1–500 mg% auf den  $O_2$ -Verbrauch des Lebergewebes deutlich herabsetzend einwirkt; je konzentrierter das Atophanyl zugesetzt wird, desto intensiver wird er gehemmt. Bei dem direkten Zusatz der Gallensäure verhält es sich aber anders; wenn man nämlich cholsaures Natrium über 10 mg% hinzusetzt, so wird der  $O_2$ -Verbrauch des Lebergewebes deutlich herabgedrückt, beim direkten Zusatz desselben Salzes zu 1 mg% nimmt er dagegen merklich zu.

Wenn man nun die Resultate über den Einfluss der intravenösen Injektion der Choleretika betrachtet, so treten ihre Wirkungen sehr deutlich zu Tage. Atophanyl und Gallensäure wirken nämlich auf die Gewebsatmung der Leber auffallend erhöhend ein, während die der Milz durch diese Salze kaum merklich beeinflusst wird. Und weil es bewiesen ist, dass salizylsaures Natrium in einer Menge, wie sie im Atophanyl enthalten ist, keinen Einfluss auszuüben imstande ist, ist die den  $O_2$ -Verbrauch der Leber erhöhende Wirkung des Atophanyls der eigentlichen Wirkung des darin enthaltenen Atophannatriums zuzuschreiben.

Es ist besonders von Interesse, dass auch die Diuretika auf die Gewebsatmung der Leber einen Einfluss auszuüben vermögen. Euphyllin und Salyrgan, deren diuretische Wirkung von Kubo in unserem Laboratorium einwandfrei festgestellt worden ist, wirken auf den  $O_2$ -Verbrauch der Leber in merklicher Weise erhöhend ein, während der der Milz dabei kaum beeinflusst wird.



Im Gegensatz dazu übt Novasurol keinen Einfluss auf den  $O_2$ -Verbrauch sowohl der Leber als auch der Milz aus. Man könnte hierbei einwenden, dass die den  $O_2$ -Verbrauch erhöhende Wirkung des Salyrgans dem darin enthaltenen Euphyllin zuzuschreiben sei. Im Salyrgan ist zwar Euphyllin in 5% enthalten, aber die Menge des in meinen Versuchen angewandten Salyrgans enthält bloss 1,25 mg Euphyllin, und andererseits wurde bewiesen, dass das Euphyllin in einer Menge von 3,7 mg auf den  $O_2$ -Verbrauch der Leber einen nur geringen erhöhenden Einfluss ausübt. Aus diesen Tatsachen dürfte man den Schluss ziehen, dass die den  $O_2$ -Verbrauch erhöhende Wirkung des Salyrgans nicht dem darin enthaltenen Euphyllin, sondern dessen eigentlichem Quecksilbersalze zuzuschreiben ist.

Kurz zusammengefasst, die Substanzen, welche eine deutliche choleretische Wirkung besitzen, erhöhen deutlich den  $O_2$ -Verbrauch der Leber. Und wenn man nun den zeitlichen Ablauf der erhöhten Gewebsatmung der Leber genau betrachtet, so wird man darauf aufmerksam, dass dieser zeitliche Ablauf mit dem Ablauf der durch solche Substanzen bewirkten Cholerese parallel läuft; die Choleretika, wie Atophan und Gallensäure, welche sehr schnell nach der Injektion die Gallensekretion anregen, erhöhen den  $O_2$ -Verbrauch der Leber in kurzer Zeit auf das Maximum, solche dagegen, wie Euphyllin und Salyrgan, die erst nach längerer Zeit choleretisch einwirken können, wirken auch auf die Gewebsatmung der Leber erst nach längerer Zeit erhöhend ein. Diese Tatsache lässt uns schliessen, dass die Cholerese wohl mit dem erhöhten  $O_2$ -Verbrauch der Leber einhergehen wird. Diese Vermutung erhält darin noch eine Stütze, dass die als Kontrollorgan gewählte Milz durch diese Choleretika kaum beeinflusst wird, und dass Novasurol, welche wie Salyrgan stark diuretisch wirkt, im Gegensatz zu diesem keinen Einfluss auf den  $O_2$ -Verbrauch der Leber ausübt.

Bei Narkotika wie Avertin und Chloralhydrat verhält es sich aber ganz anders. Diese Choleretika, welche, wie Kobayashi in unserem Laboratorium tadellos bewies, eine sehr kräftige Cholerese hervorzurufen imstande sind, setzen den  $O_2$ -Verbrauch der Leber und der Milz herab. Aber wenn man den Einfluss dieser Sub-



stanzen auf die Gewebsatmung der Leber und der Milz miteinander vergleicht, so fällt es auf, dass der  $O_2$ -Verbrauch der Leber viel weniger heruntergedrückt wird als der der Milz; der erstere ist im Anfang der Narkose kaum oder wenig gehemmt, während der der Milz von Anfang an hochgradiger absinkt. Es ist wohl bekannt, dass Narkotika wie Chloroform und Äther auf den  $O_2$ -Verbrauch allen Organe herunterdrückend einwirken. So wird dies bei Avertin und Chloralhydrat auch der Fall sein. Durch diese den Narkotika gemeinsame, den  $O_2$ -Verbrauch herunterdrückende Wirkung wird wahrscheinlich der erhöhende Einfluss der Avertin- oder Chloralhydrat-Cholereese verdeckt werden, was zur Folge hat, dass diese Narkotika trotz kräftiger choleretischer Wirkung keine Erhöhung der Gewebsatmung der Leber hervorrufen.

#### V. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Atophanyl, in einer Konzentration von 1–500 mg% direkt zur Ringerlösung zugesetzt, hemmt den  $O_2$ -Verbrauch der Leber in auffallender Weise.

2. Atophanyl, intravenös dargereicht, erhöht dagegen die Gewebsatmung der Leber auffallend; das Maximum wird schon nach 15 Minuten erreicht. Die Milz wird dabei kaum beeinflusst.

3. Natrium salizylicum übt in einer Menge, wie sie in Atophanyl enthalten ist, keinen Einfluss auf die Gewebsatmung der Leber aus. Es ist deswegen wohl zu schliessen, dass die erhöhende Wirkung des Atophanyls dem darin enthaltenen Atophannatrium zuzuschreiben ist.

4. Natrium cholicum, in einer Menge über 10 mg direkt zur Ringerlösung zugefügt, hemmt die Gewebsatmung der Leber, erhöht sie aber beim Zusatz von 1 mg. Dasselbe Salz, wie auch Natrium dehydrocholicum, erhöht auffallend den  $O_2$ -Verbrauch der Leber bei intravenöser Injektion, während die Milz kaum beeinflusst wird. Diese Erhöhung erreicht schon 30 Minuten nach Injektion ihr Maximum.

5. Unter den Diuretika wirken Euphyllin und Salyrgan, welche eine kräftige Cholereese entfalten, erhöhend auf den  $O_2$ -Verbrauch der Leber und zwar erreicht dessen Erhöhung 30–60

Minuten nach Injektion sein Maximum. Die Milz bleibt kaum beeinflusst. Novasurol, welches nicht choleretisch einwirkt, übt dagegen keinen Einfluss auf die Gewebsatmung sowohl der Leber als auch der Milz aus.

6. Aus diesen Tatsachen ist wohl der Schluss zu ziehen, dass die Cholereise mit dem erhöhten O<sub>2</sub>-Verbrauch der Leber einhergehen wird.

7. Eine Ausnahmestellung scheint aber Avertin und Chloralhydrat einzunehmen; sie wirken zwar sehr kräftig choleretisch, aber eher herunterdrückend auf den O<sub>2</sub>-Verbrauch der Leber ein.

Zum Schlusse habe ich die angenehme Pflicht zu erfüllen, Herrn Prof. S Nakagawa für seine Anregung und Anleitung zu dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

#### LITERATUR.

- Barcroft und Brodie (1905-06): Journ. of Physiol., **32**, 18; **33**, 52.  
 Barcroft und Straub (1910): Ebenda, **41**, 145.  
 Brugsch und Horsters (1923-24): Zs. ges. exp. Med., **38**, 376; **43**, 517 und 716.  
 Dubois und Fleig (1914-15): zit. n. Okada, Jour. of Physiol., **49**, 457.  
 Grasheim (1926): Zs. kl. Med., **103**, 335.  
 Hayashi und Inada (1932): Zikkenshokakibyogaku-Zasshi, **7**, 924 (Japanisch).  
 Horiuchi (1930 und 32): Tokyo-Igakkwai-Zasshi, **44** und **46** (Japanisch).  
 Iwasawa (1927): Izi-Shimbun, **155**, 256 (Japanisch).  
 Iimuro (1933): Hokkaidoigaku-Zasshi, **11**, 1550 (Japanisch).  
 Kisch (1931): Bioch. Zs., **233** 351; **242**, 26; **244**, 451.  
 Kinoshita (1930): Nippon-Byorigakkwai-Zasshi, **20**, 335 (Japanisch).  
 Kobayashi (1933): Hokkaido-Igaku-Zasshi, **11**, 2055 und 1784 (Japan.).  
 Kubo (1933): Hokkaido-Igaku-Zasshi, **11**, 2353 (Japanisch).  
 Meyerhof, Lohmann und Meier (1925): Bioch. Zs., **157**, 459.  
 Mortos und Schneider (1926): Bioch. Zs., **169**, 494.  
 Osawa (1930): Juzenkwa-Zasshi, **35**, 665 (Japanisch).  
 Reinwein (1928): Deut. Arch. kl. Med., **160**, 278.  
 Stransky (1925 und 1929): Bioch. Zs., **155**, 256 und Zs. ges. exp. Med., **66**, 73.  
 Sakamoto (1930 und 1932): Hokkaido-Igaku-Zasshi, **8**, 1827 und Diese Zs., **15**, 115.  
 Tamura und Miwa (1920): Mitt. Med. Fak. Kaiserl. Univ. Tokyo, **23**, 317.  
 Trincas, zit. n. Hayashi und Inada, l.c.

## ÜBER DIE SPEZIFITÄT DER PHOSPHATASE.

VON

RYOYU HOTTA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie  
zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 20. Juni 1934.)

Seit einigen Jahren haben wir die Spezifität der Phosphatase untersucht. Die Phosphatase können wir einteilen in die Pyrophosphatase (Kurata, 1931; Takahashi, 1932), Phosphomonoesterase (Uzawa, 1932), Phosphodiesterase (Uzawa, 1932) und Phosphamidase (Ichihara, 1933). Sie sind untereinander in isoliertem Zustand darstellbar und jedes Ferment greift für sich in spezifischer Weise eine bestimmte Bindung der Phosphorsäure an.

Die Pyrophosphatase spaltet die Anhydridbindung zwischen 2 Molekülen Phosphorsäure. Das Substrat kann das anorganische Pyrophosphat oder der saure Pyrophosphorsäureester sein, bei letzterem bedarf es aber der Mitwirkung des spezifischen Pyrophosphatasen-Aktivators.

Die Phosphomonoesterase hydrolysiert die P-O-C-Bindung in den Monoestern. Wenn der Phosphorsäurerest vorher, wie bei Pyrophosphorsäureester, durch Verbinden mit einem anderem Molekül Phosphorsäure in Pyrophosphorsäure übergeführt oder wie bei Phosphorsäurediester mit anderem Molekül Alkohol schon verestert vorhanden ist, versagt jene P-O-C-Bindung die Wirkung der Phosphomonoesterase.

Die Phosphodiesterase spaltet dagegen ein Molekül Alkohol aus dem Phosphorsäurediester ab und hinterlässt einen Phosphorsäuremonoester, der nun durch die Phosphomonoesterase abgebaut werden soll. Die Hexosediphosphorsäure wie die Resorcindiphosphorsäure gehört also nicht dem spezifischen Substrat der Diesterase an, sondern der Monoesterase.

Die Phosphamidase spaltet die P-N-Bindung, was kürzlich

eingehend von Ichihara (1933) untersucht wurde.

In der vorliegenden Mitteilung möchte der Verfasser über den Einfluss der chemischen Natur des veresterten Alkoholrests auf die Phospho-Mono- und Di-esterase berichten. Was den Verfasser zu diesem Experiment anregte, sind die Angaben von Horiuchi (1931) und Jacobsohn (1931). Der erstere untersuchte die fermentative Hydrolyse des Phytins und fand, dass dieser Inosithexaphosphorsäureester ebenso wie die synthetische Inositmonophosphorsäure durch die tierische Phosphatase ausschliesslich in saurer aber nicht in alkalischer Reaktion aufgespalten wird. Der letztere Autor hat den Mentholphosphorsäureester dargestellt. Sein Experiment ergab, dass dieser Ester weder durch die tierische noch durch die pflanzliche Phosphatase spaltbar war. Ausserdem enthält die Literatur noch Mitteilungen von Neuberg und Jacobsohn (1927, 1928) über die fermentative Hydrolyse der Borneolphosphorsäure und Cholesterinphosphorsäure. Diese beiden Monoester von alicyclischen Alkoholen waren durch die Taka-phosphatase hydrolysierbar. Mit tierischen Fermenten und in alkalischem Medium wurde aber kein Versuch gemacht.

Man sieht daraus, dass der Phosphorsäureester der hydroaromatischen Alkohole gegen die Phosphatase ein abnormes Verhalten zeigt. Es hängt sicher zusammen mit dem alicyclischen Kern des Alkoholrests, aber es gibt noch eine andere Möglichkeit, dass die OH-Gruppe in solchen Alkoholen dem sekundären Alkohol angehört. Man kann daher eine Arbeitshypothese aufstellen, dass unter Umständen ein Ester des aliphatischen sekundären Alkohols je nach seiner chemischen Natur sich wie der hydroaromatische Ester verhalten würde. Um die Sache experimentelle aufzuklären, hat der Verfasser unter Leitung von Prof. Akamatsu die phosphatatische Hydrolyse der folgenden Substrate untersucht:

1. Propyl-phosphorsäure.
2. Isopropyl-phosphorsäure.
3.  $\alpha$ -Glycero-phosphorsäure.
4.  $\beta$ -Glycero-phosphorsäure.
5.  $\alpha$ ,  $\beta$ -Dichlorpropyl-phosphorsäure.
6.  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -Dichlorpropyl-phosphorsäure.



7. sek.-Butyl-phosphorsäure.
8. Cyclohexanol-phosphorsäure.
9. (1:2)-Methylcyclohexanol-phosphorsäure.
10. (1:3)-Methylcyclohexanol-phosphorsäure.
11. Borneol-phosphorsäure.
12. Menthol-phosphorsäure.

Die Wirkung des dialysierten Nierenautolysats wurde zuerst untersucht. Diese Fermentlösung enthält nach Kurata (1931) die Phosphomonoesterase des ersten und dritten Typus. Die Monoesterase (I) hat das Optimum bei Ph 3.2 und die Monoesterase (III) bei Ph 9, wie von Asakawa (1928) und Manaka (1931) bei recht verschiedenen Substraten gezeigt wurde. Die vom Verfasser neu hergestellte Nierenfermentlösung war sehr stark wirksam und, auf das Phenyl- und  $\beta$ -Glycero-phosphat geprüft, zeigte sie zwei deutliche Optima bei Ph 3.2 und 9. Die Wirkung dieser Fermentlösung auf die oben erwähnten Phosphorsäureester der hydroaromatischen Alkohole (8–11) wurde dann bei verschiedenen Aziditäten geprüft. Sie waren alle hydrolysierbar. Die Mentholphosphorsäure machte auch keine Ausnahme. Aber entgegengesetzt dem Fall mit Phenyl- oder Glycero-phosphat konnte kein Optimum in alkalischer Reaktion beobachtet werden. Der Hydrolysegrad nahm immer zu mit Steigerung der Azidität, gipfelte bei Ph 5–6 und nach geringer Abnahme wieder bei Ph 3.2. Die Phosphomonoesterase (III), die das Glycero- oder Phenyl-phosphat bei Ph 9 optimal zu hydrolysieren vermag, wirkt also nicht auf die Phosphorsäureester der hydroaromatischen Alkohole. Wir sagen aber dabei nicht, dass solche Phosphorsäuremonoester überhaupt nicht in alkalischer Reaktion z.B. bei Ph 8 spaltbar sind. Nach den Arten der alicyclischen Oxyverbindungen zeigten selbstverständlich die Diester eine variierende phosphatatische Spaltbarkeit und daher mögen die Ester auch bei Ph 8 hydrolysiert werden, aber der Hydrolysegrad ist dabei immer niedriger als bei Ph 7 und 6. Die eventuell beobachtete Hydrolyse bei alkalischer Reaktion ist also als die Wirkung der bei Ph 5–6 wirksamen Monoesterase anzunehmen. Die hydroaromatischen Alkohole und ihre Phosphorsäureester übten keinen Einfluss auf die Glycerophosphat-



hydrolyse durch die Monoesterase (III) aus. Das zweite abnorme Verhalten der hydroaromatischen Ester zeigte sich darin, dass die Ester durch das Nierenferment, dessen Optimum für das Glycero- oder Phenyl-phosphat Ph 3.2 ist, bei Ph 5-6 und Ph 3 optimal spaltbar waren. Nur wurde das Mentholphosphat bloss bei Ph 6 optimal gespalten, was auf das Niederschlagen des Substrats bei stärkerer Azidität zurückzuführen ist. Der Verfasser hat andererseits die gereinigte Taka-phosphatase, Monoesterase (I), und die Reiskleien-phosphatase, Monoesterase (II), auf die hydroaromatischen Ester wirken lassen. Für das erste Ferment war das Optimum Ph 3 und für das zweite Ph 5.6, wie bei Glycerophosphat-hydrolyse durch die respektiven Monoesterasen. Wir sind vorläufig nicht im Stande aufzuklären, warum das Nierenferment ausser dem eigentlichen Optimum ein zweites sogar noch stärker hervorragendes Optimum bei Ph 5-6 zeigt. Es mag sein, dass die Monoesterase (II), die wie das Reiskleienferment bei Ph 5-6 optimal wirkt, in geringer Menge beigemischt vorhanden sei und dass diese Esterase (II) auf die hydroaromatischen Ester weit kräftiger als die Esterase (I) wirksam sein könne. Die Existenz der tierischen Monoesterase (II) wurde früher von Hori (1932) bewiesen.

Wir haben dann bei verschiedenen Aziditäten die phosphatische Hydrolyse der Monoester von aliphatischen Alkoholen (1-7) untersucht. Wie das  $\beta$ -Glycerophosphat wurden auch  $\alpha$ -Glycerophosphat,  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -Dichlorpropyl-phosphat,  $\alpha$ ,  $\beta$ -Dichlorpropyl-phosphat und  $n$ -Propyl-phosphat durch die Nierenfermentlösung bei Ph 3.2 und 9 optimal und in 2 Stunden fast zu 100% aufgespalten; die Monoesterase (I) und (III) wirkten dabei mit. Aber das Isopropyl-Phosphat verhielt sich ganz anders. Hier versagte die Wirkung der Monoesterase (III) wie bei hydroaromatischen Estern. Das von Asakawa (1929) angegebene Optimum Ph 9 konnte bei wiederholten Versuchen nicht beobachtet werden.

Die Hydrolysierbarkeit der  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -Dichlorpropyl- und  $\beta$ -Glycerophosphate durch die Monoesterase (III) bezieht sich also auf die Halogen- oder Hydroxy-substitution an den beiden endständigen Kohlenstoffatomen. Der Phosphorsäuremonoester des sekundären

Butylalkohols konnte auch durch Monoesterase(III) nicht gespalten werden.

Der Verfasser konnte damit bewiesen, dass die Monoester der hydroaromatischen und der nicht substituierten aliphatischen sekundären Alkohole überhaupt wohl durch die Monoesterase, aber bloss durch die (I) und (II) Esterase und nicht durch die (III), spaltbar sind. Ob das Verhalten der hydroaromatischen Ester mit der dem sekundären Alkohol zugehörenden OH-Gruppe zu tun hat, kann man nicht ohne weiters sagen. Wir möchten hierbei vielmehr die Spezifität der Phosphomonoesterase betonen.

Angesichts des spezifischen Einflusses der aliphatischen sekundären und hydroaromatischen Alkoholreste auf die phosphatatische Zugänglichkeit wurden die Phosphorsäure-diester synthetisch dargestellt, die jene Alkoholreste in sich verestert besitzen. Sie waren:

1.  $\alpha$ -Methylpropyl-phosphorsäure-phenylester,
2. Cyclohexanol-phosphorsäure-phenylester,
3. Bis-sek.-Butyl-phosphorsäure,
4. Bis-Cyclohexanol-phosphorsäure,

und ausserdem für Kontrollversuche

5. prim.-n-Butyl-phosphorsäure-phenylester und
6. Äthyl-phosphorsäure-phenylester.

Die phosphatatische Spaltung der Phosphorsäure-diester haben Asakawa (1929) und Uzawa (1932) eingehend untersucht. Asakawa hat mit Taka-phosphatase Diphenyl-, Diäthyl- und Diglycerophosphat hydrolysiert. Das Optimum war Ph 5.6. Dieselben Diester waren auch durch die Nierenphosphatase hydrolysierbar. Die optimale Azidität wurde bei Ph 7.8 gefunden. Damals war es aber noch nicht bekannt, dass in der Nierenfermentlösung ausser der in alkalischer Reaktion wirksamen Phosphatase, Phosphomonoesterase (III) in jetzigem Sinne, noch die Phosphoesterase (I) vorhanden ist, was erst zwei Jahre später von Horiuchi (1931), Kurata (1931) und Hori (1932) aufgehehlt wurde. Die Differenzierung der Phosphodiesterase und Monoesterase wurde auch später von Uzawa (1932) ausgeführt. Uzawa hat im Habu-Gift eine spezifische Phosphodiesterase gefunden, die den Phosphor-

säurediester in Phosphorsäuremonoester und Alkohol zerlegt, aber auf den Monoester selbst unwirksam ist. Diese Diesterase in Habu-Gift hat das Optimum bei Ph 8.6–9, wie schon früher von Uzawa angegeben wurden und was auch bei nächster Gelegenheit von Udagawa mitgeteilt werden wird. Wir möchten jetzt vorläufig berichten, dass es Udagawa gelang, eine Diesterase aus Taka-dia-*stase* (*Aspergillus oryzae*) ganz frei von Monoesterase zu isolieren. Diese Taka-diesterase hat das Optimum bei Ph 6. Ich habe die dialysierte Nierenfermentlösung zuerst auf das Diphenylphosphat bei verschiedenen Aziditäten wirken lassen. Die Optima wurden bei Ph 5–6 und 7.8 gefunden. Es ist anzunehmen, dass in der Niere ausser der Diesterase des Habu-Gift-typus eine in saurer Reaktion wirksame Diesterase vorhanden ist. Es ist aber noch dahingestellt, ob diese Diesterase mit der Diesterase von Udagawa zu demselben Typus gehört, weil die Isolierung der Nierendiesterase uns noch nicht gelang. Mit der Nierenfermentlösung hat der Verfasser zuerst die Hydrolyse des Äthyl-phosphorsäurephenylesters und prim.-n-Butylphosphorsäurephenylesters untersucht. Die Ph Abhängigkeit der Dephosphorierung war genau so wie bei Diphenylphosphatspaltung.

Was den Verfasser interessierte, war aber die Hydrolyse des Diesters, der den hydroaromatischen oder nicht substituierten aliphatischen sekundären Alkoholrest enthält. Als die dialysierte Nierenphosphatasenlösung auf den sek-Butyl-phosphorsäurephenylester und Cyclohexanol-phosphorsäurephenylester einwirkte, konnte das anorganische Phosphat maximal bei Ph 3 und 9–10 ermittelt werden. Dieses Resultat mag scheinbar so gedeutet werden, dass diese Diester durch Zusammenwirkung von der Di- und Monoesterase dephosphoriert wurden. Der Verfasser hat aber die enorm schnelle Hydrolyse der erwähnten Diester bemerkt und auf sie die diesterasen-freien Monoesterasen wirken lassen. Die Fermentlösungen waren die nach Kurata (1931) isolierte Lebermonoesterase (I) und die nach Takahashi (1932) hergestellte Darnmonoesterase (II), welche beiden das Diphenylphosphat nicht spalten konnten. Es war sehr überraschend, dass die beiden Diester schnell aufgespalten wurden und schon in 2 Stunden eine

beträchtliche Menge von anorganischem Phosphat geliefert wurde. Dieser Befund, dass der Diester, welcher je ein Molekül Phenol und Cyclohexanol oder sekundäres Butylalkohol enthält, durch die Monoesterase hydrolysiert werden konnte, war darum sehr wichtig, weil, wie erwähnt, die Monoester von diesen Alkoholarten ein abnormes Verhalten gegen die Monoesterase äussern und von der Monoesterase (III) überhaupt nicht dephosphorierbar sind. Bei der Hydrolyse des sek.-Butyl-phosphorsäure-phenylesters durch die diesterasefreie Monoesterase (III) muss also der sekundäre Butylalkoholrest zuerst abgespalten und das zurückbleibende Phenylphosphat weiter hydrolysiert werden. Denn wenn die Phenolabspaltung vorangeht, soll das hinterlassene sek.-Butylphosphat der Monoesterase (III) widerstehen. Diese Annahme konnten wir experimentell wie folgt beweisen. Der sek.-Butyl-phosphorsäurephenylester wurden bei Ph 9.2 mit der Nierenfermentlösung bei 37° gestellt. Nach 30 Minuten, als nur Spuren anorganischen Phosphors darin zu beweisen waren, wurde die Lösung mit Trichloressigsäure enteiweisst, gegen Lackmus neutralisiert und mit Bleiacetat gefällt. Das Bleisalz wurden mit  $H_2S$  zerlegt, das Filtrat durchlüftet, mit Kalilauge gegen Phenolphthalein neutralisiert, unter vermindertem Druck konzentriert und mit grossem Volumen Alkohol versetzt. Das Kaliumsalz des sek.-Butyl-phosphorsäurephenylesters blieb in Lösung, während ein kristallisches Salz gefällt wurde. Es wurde analytisch als Kalium Phenylphosphat festgestellt. 1 g Diester ergab 0.2 g Kalium Phenylphosphat.

Als Phosphorsäure jedoch mit 2 Molekülen Cyclohexanol oder sek.-Butylalkohol verestert und in Diester übergeführt wurde, wirkten die Monoesterase (I) und (III) darauf nicht. Zum Entstehen des anorganischen Phosphors mussten sie durch Zusammenwirken der Diesterase und Monoesterase abgebaut werden. Das Verhältnis war also ganz analog wie bei dem Diphenylphosphat. Ein Unterschied war nur darin bemerkbar, dass die erwähnten zwei Diester in alkalischer Reaktion kein Optimum der Dephosphorierung zeigten, was selbstverständlich damit erklärt werden kann, dass durch die Diesterasenwirkung entstehende Monoester des sek.-Butylalkohols oder Cyclohexanols, wie erwähnt, der Monoesterase



(III) widersteht. Dass die Wirkung der Diesterase auch in alkalischer Reaktion wirklich vonstatten gegangen ist, konnte wie folgt bewiesen werden. Der Phosphorsäurediester des sek.-Butylalkohols wurde zuerst bei Ph 9.2 mit Nierenfermentlösung 3 Stunden bei 37° stehen gelassen. Kein anorganisches Phosphat war dabei nachweisbar. Der Hydrolysenansatz wurde 10 Minuten auf 100° erhitzt, um die Fermentwirkung zu unterbrechen, dann auf Ph 3 angesäuert und mit der Lebermonoesterase versetzt, die frei von Diesterase ist und von sich aus nicht auf den Diester des sek.-Butylalkohols einzuwirken vermag. In 2 Stunden konnten 8.4% des gesamten Phosphors als anorganisches Phosphat nachgewiesen werden, was nichts anderes bedeutet als, dass bei Ph 9 in 3 Stunden über 8.4% Diester in sek.-Butylalkohol und ihr Monoester aufgespalten worden war.

Der Verfasser hat schon gezeigt, dass der sek.-Butyl- oder Cyclohexanol-phosphorsäurephenylester durch die Monoesterase ohne Mitwirkung der Diesterase zuerst in sek.-Butylalkohol resp. Cyclohexanol und Phenylphosphorsäure aufzuspalten ist. Es soll dann untersucht werden, ob die Diesterase, das Habu-Gift, überhaupt imstande sei, aus jenen Diestern ein Molekül Phenol abzuspalten. Da der Versuch mit dem Habu-Gift aber lange fortgesetzt werden sollte, wurde der (1:2)-Methyleyclohexanol-phosphorsäurephenylester hergestellt, der für sich in alkalischer Reaktion sehr beständig doch durch die Monoesterase (I) und (III) sehr schnell hydrolysierbar war. Das Experiment ergab, dass das Habu-Gift aus diesem Diester bei Ph 9 in 40 Stunden keine Phenolabspaltung bewirkte. Aus dem Versuchsansatz (1.0 g Diester) konnte der Verfasser 0.5 g Diester als rein kristallinisches Kalisalz wiedergewinnen, aber weder Monoesterkalisalz noch anorganisches Phosphat war nachweisbar.

Wenn man also den Phenolrest oder den prim. Alkoholrest mit a, den aliphatischen sekundären (nicht bei benachbarten C-Atomen substituierten) oder hydroaromatischen Alkoholrest mit b und den Phosphorsäurerest mit Ph.s. bezeichnet, wird die Hydrolyse des Diesters  $b\text{-Ph.s.-b} = b + b\text{-Ph.s.}$ , wie bei  $a\text{-Ph.s.-a} = a + a\text{-Ph.s.}$ , durch die spezifische Wirkung der Phosphodiesterase aus-



geführt, während die Diester-hydrolyse  $b\text{-Ph.s.} \cdot a = b + a\text{-Ph.s.}$  bloss durch die Monoesterase ohne Diesterase stattfinden kann. Der Diester-abbau in solcher Weise, wie  $b\text{-Ph.s.} \cdot a = b\text{-Ph.s.} + a$ , ist überhaupt der Diesterase nicht zugänglich. Ausserdem ist der Monoester  $a\text{-Ph.s.}$  durch jede Monoesterase (I, II oder III) spaltbar, aber der Monoester  $b\text{-Ph.s.}$  versagt die Wirkung der Monoesterase (III).

Wir wissen damit, dass die Spezifität der Phosphatase nicht nur, wie früher anerkannt, durch die Bindungsweise der Phosphorsäure, sondern auch durch die chemische Natur der gebundenen Alkoholreste bedingt wird.

### Experimenteller Teil.

#### I. DARSTELLUNG DER PHOSPHORSÄUREESTER.

##### 1. Borneolphosphorsäure.

Borneolphosphorsäure wurde nach der Angabe von Neuberg, Wagner und Jacobsohn (1927) dargestellt.

*Analyse:*  $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{P}$  (234)

berechnet P 13.2%      gefunden P 13.2%

##### 2. sek.-Butyl-phosphorsäure.

Man mischt 7.0 g Phosphorpentoxyd ( $M/20$ ) und 9.8 g 100 %iger Phosphorsäure ( $M/10$ ) im Becherglase. Der grösste Teil des Phosphorpentoxyds geht bald unter Wärmeentwicklung in Lösung über. 7.4 g sekundäres Butylalkohol ( $M/10$ ) werden dann in Portionen unter gutem Umrühren hinzugesetzt und die Reaktionsmasse wird im Wasserbad einige Stunden erwärmt. Man löst sie in 200–300 ccm Wasser und versetzt mit verdünntem Ammoniakwasser bis zur Kongorotneutralität. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck bis zur Trockenheit eingedampft und der Rückstand mit heissem Absolutalkohol extrahiert. Bei Ätherzusatz scheidet sich daraus das saure Ammonium Butylphosphat als kleine Nadeln mit 1 Molekül Kristallwasser aus. Das über  $\text{P}_2\text{O}_5$  bei  $100^\circ$  getrocknete Salz ergab die folgende Analyse.

*Analyse:*  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4\text{PNH}_4$  (171.01)

berechnet P 18.1%      gefunden P 18.1%

### 3. Cyclohexanolphosphorsäure.

Cyclohexanol wird in derselben Weise wie oben phosphoriert. Das saure Ammoniumsalz kristallisiert in feinen Nadeln und enthält 1 Molekül Kristallwasser.

*Analyse:*  $C_6H_{10}O_4PNH_4$  (195)

berechnet P 15.9%      gefunden P 16.1%

### 4. (1:2)-Methylcyclohexanol-phosphorsäure.

Man mischt 11.4 g 1-Methyl-cyclohexanol-(2) und 15.3 g Phosphoroxchlorid ( $M/10$ ). Die Reaktion geht sogleich vor sich unter HCl-Entwicklung. Die Reaktionsmasse wird eine Stunde beiseite gestellt. Man löst sie in 1 Liter Wasser, versetzt mit 95 g fein gepulvertem Bariumhydroxyd ( $3M/10$ ) und entfernt den überschüssigen Baryt durch Kohlensäure. Aus dem klaren Filtrat scheidet sich nach Zusatz des gleichem Volumens Alkohol das Bariumsalz des (1:2)-Methylcyclohexanol-phosphats als kleine nadelige Kristalle aus. Sie werden auf der Nutsche gesammelt und mit Wasser gewaschen. Das Bariumsalz enthält 2 Moleküle Kristallwasser und ist chlorfrei.

*Analyse:*  $C_7H_{13}O_4PBa$  (329.4)

berechnet P 9.41%      gefunden P 9.42%

berechnet Ba 41.7%      gefunden Ba 41.6%

### 5. (1:3)-Methyl-cyclohexanol-phosphorsäure.

Man mischt 11.4 g 1-Methyl-cyclohexanol-(3) ( $M/10$ ) und 15.3 g Phosphoroxchlorid ( $M/10$ ). Nach einer Stunde löst man die Reaktionsmasse in 1 Liter Wasser, versetzt mit fein gepulvertem Magnesiumoxyd ( $3M/10$ ), lässt 24 Stunden stehen und entfernt dann den anorganischen Phosphor durch  $NH_3$  und  $NH_4Cl$  als  $MgNH_4PO_4$ . Die klar filtrierte Lösung wird mit  $BaCl_2$  (10%) versetzt. Das Barium (1:3)-Methyl-cyclohexanol-phosphat scheidet sich als kleine nadelige Kristalle aus.

*Analyse:*  $C_7H_{13}O_4PBa$  (329.4)

berechnet P 9.41%      gefunden P 9.36%

berechnet Ba 41.7%      gefunden Ba 40.7%

6. *sek.-Butyl-phosphorsäure-phenylester.*

Man erhitzt 18 g Phenylphosphordichlorid ( $M/10$ ) und 7.4 g sekundäres Butylalkohol ( $M/10$ ) bei  $100^{\circ}$  unter Rückusskühler bis zu Aufhören der HCl-Gasentwicklung. Die Reaktionsmasse wird mit 20–30 fachem Volumen Wasser gemischt, wobei der grösste Teil in Lösung geht. Die abgekühlte Lösung wird mit Kaliumcarbonat neutralisiert und filtriert. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck bis zur Trockenheit eingedampft, und der Rückstand mit heissem Absolutalkohol extrahiert. Bei Äterzusatz scheidet sich aus dem Auszug das Kaliumsalz des Diesters als nadelige Kristalle aus.

*Analyse:*  $C_{10}H_{13}O_4PK(268.2)$

berechnet P 11.6%      gefunden P 11.4%

7. *n-Butyl-phosphorsäure-phenylester.*

Das Kaliumsalz dieses Diesters kann man in gleicher Weise wie das vorstehende sek.-Butylderivat herstellen. Es ist kristallwasserfrei.

*Analyse:*  $C_{10}H_{13}O_4PK(268.2)$

berechnet P 11.6%      gefunden P 11.6%

8. *Cyclohexanol-phosphorsäure-phenylester.*

Das Kaliumsalz dieser Estersäure kann aus Cyclohexanol und Phenylphosphoroxychlorid in oben beschriebener Weise hergestellt werden. Kristallwasser 2 Moleküle.

*Analyse:*  $C_{12}H_{16}O_4PK(294.2)$

berechnet P 10.5%      gefunden P 10.4%

9. *(1:2)-Methylcyclohexanol-phosphorsäure-phenylester.*

Das Kaliumsalz ist herstellbar ganz in gleicher Weise wie die anderen Diester-salze. Kristallwasserfrei.

*Analyse:*  $C_{13}H_{18}O_4PK(308.2)$

berechnet P 10.1%      gefunden P 10.1%

10. *Bis-sek.-Butyl-phosphorsäure.*

Man mischt 18.5 g sekundäres Butylalkohol ( $M/4$ ) und 15.3 g

Phosphoroxychlorid ( $M/10$ ). Nach Stehenlassen über Nacht im Exsikkator über KOH wird das Gemisch in 200 ccm Wasser gelöst und mit Kaliumcarbonat so lange versetzt, bis die Lösung gegen Phenolphthalein neutral reagiert. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck bis zu Trockenheit eingedampft, und der Rückstand mit heissem Absolutalkohol extrahiert. Aus dem Auszug kann man das Kaliumsalz durch Ätherzusatz als kristallinische Masse bekommen. Das Salz enthält 1 Molekül Kristallwasser.

*Analyse:*  $C_8H_{18}O_4PK$  (248.3)

berechnet P 12.5%      gefunden P 12.6%

#### 11. *Biscyclohexanol-phosphorsäure.*

Das Kaliumsalz wird wie (10) hergestellt. Kristallwasser . 1 Molekül.

*Analyse:*  $C_{12}H_{22}O_4PK$  (300.2)

berechnet P 10.3%      gefunden P 10.4%

#### 12. *Menthol-phosphorsäure.*

Die freie Estersäure ist nach der Angabe von Jacobsohn (1931) hergestellt.

*Analyse:*  $C_{10}H_{21}O_4P$  (236.2)

berechnet P 13.1%      gefunden P 13.2%

#### 13. *Isopropyl-phosphorsäure.*

Isopropylalkohol wird vorher mit Natriumsulfat getrocknet und destilliert. Siedepunkt  $82^\circ$ . Phosphorierung wird wie bei sek.-Butyl-phosphorsäure(I) ausgeführt. Die erhitzte Reaktionsmasse wird in 500 ccm Wasser gelöst, mit gesättigter Barytlösung gegen Phenolphthalein neutralisiert. Das gefällte Bariumphosphat wird abfiltriert und das überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt. Beim Konzentrieren des Filtrats unter vermindertem Druck scheidet sich zuerst eine amorphe Masse aus, die abfiltriert wird. Die weiter bis 100 ccm eingedampfte Lösung wird mit gleichem Volumen Alkohol versetzt. Das Barium Isopropylphosphat fällt als rhombische Tafeln aus. Kristallwasser 2 Moleküle.

*Analyse:*  $C_8O_4H_7P\text{Ba}$  (275.5)

berechnet P 11.3%      gefunden P 11.3%

berechnet Ba 50.1%      gefunden Ba 49.5%

14. Barium Propylphosphat.
15. Barium  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -Dichlor-propyl-phosphat.
16. Barium  $\alpha$ ,  $\beta$ -Dichlor-propyl-phosphat.
17. Kalium Diphenyl-phosphat.
18. Silbersalz Äthyl-phosphorsäure-phenylesters.
19. Kalium Monophenylphosphat.
20. Barium  $\alpha$ -Glycerophosphat.

Diese 7 Salze sind Präparate des hiesigen Instituts und wurden früher von Asakawa (1929), Manaka (1931) und Uzawa (1932) hergestellt.

21. Natrium  $\beta$ -Glycerophosphat (Kahlbaum).

## II. DARSTELLUNG DER FERMENTLÖSUNG.

1. Das Nierenferment nach Asakawa (1928).
2. Die Taka-monoesterase (I) nach Kobayashi (1927).
3. Die Monoesterase (I) aus Schweineleber nach Kurata (1931).
4. Das Reiskleienferment, Monoesterase (II), nach Uzawa (1932) aber ohne Reinigung durch die Adsorptionsmethode.
5. Die Monoesterase (III) nach Takahashi (1932).
6. Das Habu-Gift wurde uns von dem kaiserlichen Institut für Infektionskrankheiten überlassen, wofür ich dem Herrn Dr. S. Hosoya zu verbindlichstem Dank verpflichtet bin.

## III. VERSUCHSANORDNUNG.

Bei den fermentativen Versuchen bestand die Lösung im allgemeinen aus:

$M/200$ Substratlösung	5.0 ccm
Puffer	5.0 „
Wasser	5.0 „
Fermentlösung	5.0 „

Die endliche Konzentration des Substrats war also in jedem Falle  $M/800$ . Barium- oder Silbersalz wurde vorher in Natriumsalz übergeführt.



Pufferlösung war  $M/2$  Acetat-Essigsäure,  $M/10$  Glykokoll-HCl oder  $M/10$  Glykokoll-NaOH. Die Versuchstemperatur war  $37^\circ$ , Ph elektrometrisch. Die in den nachstehenden Protokollen angegebenen Zahlen bedeuten die abgespaltene Phosphorsäure als P in mg für 1 ccm Versuchslösung berechnet. 100%ige Hydrolyse soll also 0.0388 mg P liefern. P-Bestimmung nach Fiske-Subbarow (1925).

## IV. VERSUCHSERGEBNISSE.

## 1. n-Propyl-phosphorsäure + Nierenphosphatase.

PH	nach 1 Stde.	
	P in mg	%
2.0	0	0
3.1	0.0111	29
4.2	0.0072	18
5.0	0.0101	26
5.8	0.0106	27
6.6	0.0111	29
8.2	0.0132	34
9.3	0.0168	44
10.5	spur	0

## 2. Isopropyl-phosphorsäure + Nierenphosphatase.

PH	nach 1 Stde.	
	P in mg	%
2.0	0	0
3.1	0.0088	22
4.1	0.0050	13
5.0	0.0081	20
5.8	0.0071	18
6.6	0.0048	13
8.0	0	0
9.2	0	0

## 3. sek.-Butyl-phosphorsäure + Nierenphosphatase.

PH	nach 2 Stdn.	
	P in mg	%
2.0	0	0
3.1	0.0219	57
4.1	0.0284	47
5.0	0.0189	48
6.1	0.0181	47
6.3	0.0171	44
7.5	0.0160	41
8.7	0.0072	13
9.2	0	0

## 4. Cyclohexanol-phosphorsäure + Nierenphosphatase.

PH	nach 2 Stde.	
	P in mg	%
2.0	0	0
3.1	0.0242	63
4.1	0.0229	59
5.0	0.0262	68
6.1	0.0291	75
6.4	0.0174	45
7.6	0.0132	35
8.8	0.0035	9
9.9	0	0

## 5. (1:2)-Methyleyclohexanol-phosphorsäure + Nierenphosphatase.

PH	nach 1 Stde.	
	P in mg	%
2.0	0	0
3.2	0.0163	42
4.0	0.0150	39
5.0	0.0181	47
5.8	0.0200	51
6.7	0.0181	47
7.6	0.0140	36
9.1	0	0

## 6. (1:3)-Methyleyclohexanol-phosphorsäure + Nierenphosphatase.

PH	nach 1 Stde.	
	P in mg	%
2.0	0	0
3.2	0.0192	50
4.0	0.0152	40
5.0	0.0200	51
5.8	0.0220	56
6.8	0.0191	49
8.2	0.0105	27
9.3	0	0

## 7. Borneol-phosphorsäure + Nierenphosphatase.

PH	nach 1 Stde.	
	P in gm	%
2.0	0	0
3.1	0.0092	24
4.1	0.0087	23
5.0	0.0113	29
5.9	0.0114	29
6.6	0.0106	27
7.9	0.0071	19
8.9	0	0
9.8	0	0

## 8. Menthol-phosphorsäure + Nierenphosphatase.

PH	nach 1 Stde.	
	P in mg	%
2.0	0	0
3.1	0	0
4.1	spur	0
5.2	0.0082	21
6.1	0.0093	24
6.7	0.0058	14
7.9	spur	0
8.9	0	0

## 9. Sek.-Butyl-phosphorsäure + Taka-phosphatase.

PH	nach 2 Stdn.	
	P in gm	%
2.2	0.0130	36
3.1	0.0261	70
4.1	0.0250	65
5.0	0.0081	21
5.9	0.0074	19
6.7	0	0

## 10. Borneol-phosphorsäure + Taka-phosphatase.

PH	nach 2 Stdn.	
	P in mg	%
2.0	0	0
3.1	0.0384	99
4.1	0.0342	88
5.0	0.0316	81
5.9	0.0107	28
6.7	spur	0

## 11. (1:3)-Methyleyclohexanol-phosphorsäure + Taka-phosphatase.

PH	nach 1 Stde.	
	P in mg	%
2.2	0.0274	61
3.1	0.0355	92
4.1	0.0340	87
5.0	0.0304	78
5.9	0.0164	46
6.7	0	0

## 13. sek.-Butyl-phosphorsäure + Reiskleien-phosphatase.

PH	nach 1 Stde.	
	P in mg	%
2.1	spur	0
3.1	0.0087	23
4.1	0.0109	28
5.0	0.0127	32
5.6	0.0140	36
6.0	0.0137	35
6.7	0.0129	33
8.1	0.0118	31
9.2	0.0106	27
10.1	0	0

## 15. Borneol-phosphorsäure + Reiskleien-phosphatase.

PH	nach 24 Stdn.	
	P in mg	%
3.1	0.0108	28
4.1	0.0165	44
5.6	0.0267	69
6.7	0.0090	23
8.1	0	0

## 12. (1:2)-Methyleyclohexanol-phosphorsäure + Taka-phosphatase.

PH	nach 1 Stde.	
	P in mg	%
2.2	0.0046	12
3.1	0.0182	49
4.1	0.0152	41
5.0	0.0131	34
5.9	0.0089	22
6.7	0	0

## 14. (1:2)-Methyleyclohexanol-phosphorsäure + Reiskleien-phosphatase.

PH	nach 1 Stde.	
	P in mg	%
3.1	spur	0
4.2	0.0064	17
5.6	0.0118	30
6.7	0.0042	11

## 16. (1:3)-Methyleyclohexanol-phosphorsäure + Reiskleien-phosphatase.

PH	nach 1 Stde.	
	P in mg	%
3.1	spur	0
4.1	0.0062	16
5.6	0.0124	32
6.7	spur	0

## 17. Diphenyl-phosphorsäure + Nierenphosphatase.

PH	nach 24 Stdn.	
	P in mg	%
3.1	0.0077	20
4.1	0.0103	27
5.1	0.0126	33
5.8	0.0112	29
6.4	0.0108	28
7.8	0.0132	34
9.2	0.0708	18

## 18. Bis-sek.-butyl-phosphorsäure + Nierenphosphatase.

PH	nach 2 Stdn.	nach 24 Stdn.	
	P in mg	P in mg	%
3.1	spur	0.0142	37
4.1	0.0172	0.0282	73
4.9	0.0176	0.0304	78
6.6	0.0064	0.0208	54
9.2	0	0.0031	8
9.8	0	0	0

19. Diphenyl-phosphorsäure, n-Butyl-phosphorsäure-phenylester, Äthyl-phosphorsäure-phenylester, Bis-sek.-butyl-phosphorsäure oder Biscyclohexanol-phosphorsäure + Lebermonoesterase(I). Bei Ph 3-7 konnte in 24 Stunden kein anorganisches Phosphat nachgewiesen werden.

20. Diphenyl-phosphorsäure, n-Butyl-phosphorsäure-phenylester, Äthyl-phosphorsäure-phenylester, Bis-sek.-butyl-phosphorsäure oder Biscyclohexanol-phosphorsäure + Darm-monoesterase(III). Bei Ph 8, 9 und 10 war in 24 Stunden kein anorganisches Phosphat nachweisbar.

## 21. sek.-Butyl-phosphorsäure-phenylester + Nierenphosphatase.

## 22. sek.-Butyl-phosphorsäure-phenylester + Lebermonoesterase(I).

PH	nach 2 Stdn.		PH	nach 2 Stdn.	
	P in mg	%		P in mg	%
2.2	0.0086	22	2.2	spur	0
3.1	0.0381	98	3.1	0.0076	20
4.1	0.0378	98	4.1	0.0084	22
5.2	0.0374	97	5.1	0.0114	30
6.1	0.0318	82	5.9	0.0102	26
6.4	0.0268	67	6.5	0.0044	11
8.1	0.0238	61			
9.1	0.0388	100			

## 23. sek.-Butyl-phosphorsäure-phenylester + Darm-monoesterase (III).

PH	nach 2 Stdn.	
	P in mg	%
8.0	spur	0
9.1	0.0103	26
9.8	0.0187	48

## 24. Cyclohexanol-phosphorsäure-phenylester + Nieren-phosphatase.

PH	nach 2 Stdn.	
	P in mg	%
3.1	0.0274	71
4.1	0.0244	63
4.9	0.0236	61
5.8	0.0186	48
6.7	0.0131	34
7.9	0.0169	44
9.2	0.0308	80
9.8	0.0168	43

## 25. Cyclohexanol-phosphorsäure-phenylester + Leber-monoesterase (I).

PH	nach 2 Stdn.	
	P in mg	%
3.1	0.0064	16
4.1	0.0066	17
5.0	0.0134	35
5.9	0.0117	30
6.5	0.0043	11

## 26. Cyclohexanol-phosphorsäure-phenylester + Darm-monoesterase (III).

PH	nach 2 Stdn.	
	P in mg	%
8.0	0.0196	27
9.1	0.0337	87
9.9	0.0244	63

## LITERATUR.

- Asakawa, K. (1928): J. of Biochem., **10**, 157.  
 Asakawa, K. (1929): J. of Biochem., **11**, 143.  
 Hori, W. (1933): J. of Biochem., **16**, 433.  
 Horiuchi, K. (1931): J. of Biochem., **14**, 163.  
 Ichihara, M. (1933): J. of Biochem., **18**, 87.  
 Jacobsohn, K. P. (1931): Biochem. Zeitschr., **230**, 307.  
 Kobayashi, H. (1927): J. of Biochem., **8**, 205.  
 Kurata, K. (1931): J. of Biochem., **14**, 25.  
 Manaka, C. (1931): J. of Biochem., **14**, 191.  
 Neuberg, C. (1932): Biochem. Zeitschr., **253**, 152.  
 Neuberg, C. u. Jacobsohn, K. P. (1928): Biochem. Zeitschr., **199**, 507.  
 Neuberg, C., Wagner, J. u. Jacobsohn, K. P. (1927): Biochem. Zeitschr., **188**, 230.  
 Takahashi, H. (1932): J. of Biochem., **16**, 447 u. 463.  
 Uzawa, S. (1932): J. of Biochem., **15**, 1 u. 19.







檢 印



## Contents

No. 2, September, 1934.

SAKAI, Tadawo. Studies on biological reduction. VI. The oxidation of sugar by striated and heart muscles of fowls fed on polished rice and the behavior of adrenal cortex .....	193
VII. On the oxidation of lactic acid in the heart muscle of vitamin-B deficient fowls .....	205
MIYAZAKI, Torazo. Biochemical studies on carbohydrates. V. A micro method for quantitative estimation of chondroitin sulfuric acid in cartilage .....	211
VI. The quantitative observation of chondroitinsulfuric acid in cartilage and bone .....	223
KAWABE, Kinji. Biochemical studies on carbohydrates. VII. On an enzyme which disintegrates glucosamine .....	233
VIII. The distribution of glucosamine among tissues when it is administered into the animal body subcutaneously or parenterally, and its renal threshold .....	243
IKEDA, Goichi. Die chemische Untersuchungen des Darmes. I. Mitteilung. Chemische Untersuchung des Darmsaftes .....	253
II. Mitteilung. Durchblutungsversuche des Darmes mit Harnstoff ....	261
III. Mitteilung. Durchblutungsversuch des Darmes mit Glykokoll ....	271
IV. Mitteilung. Durchblutungsversuche des Dünndarmes mit <i>D</i> -Alanin .....	279
MIYAZAKI, Torazo. Biochemical studies on carbohydrates. IX. On the fermentation of chondroitinsulfuric acid by <i>B. pyocyaneus</i> and on pyocyanine .....	287
KAWABE, Kinji. Biochemical studies on carbohydrates. X. The fate of glucosamine in the animal body .....	293
MASAMUNE, Hajime. Biochemical studies on carbohydrates. XI. On the constitution of benzoylglucuronic acid and the enzyme which hydrolyses this compound .....	311
OHASHI, Kaname. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel. (XXXII). Glykogenbildung der Leber und das Ph des Harns von hungernden Kaninchen unter Einfluss von Gallensäure .....	319
NAKAGAWA, Hideo. Über den Einfluss der Choleretika auf die Gewebsatmung der Leber .....	327
HOTTA, Ryoyu. Über die Spezifität der Phosphatase .....	343